

INTEGRAÇÃO DE TRATAMENTOS PÓS-COLHEITA FÍSICOS (CALOR E ULTRASSONS) E BIOCONTROLO NA CONSERVAÇÃO DE PERA ROCHA INTEIRA E NA APTIDÃO PARA PROCESSAMENTO

Duarte Francisco Pequeno Coelho

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu

Coorientador: Professora Doutora Margarida Gomes Moldão-Martins

Coorientador: Engenheira Mestre Carla Sofia Marques de Alegria

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais:

Doutor Vítor Manuel Moniz Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

2015

Agradecimentos

A realização de todo o presente relatório não teria sido possível sem a ajuda e contribuição de diversas pessoas a quem expresso de seguida os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar, ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, na pessoa do Doutor Carlos Santos, por ter proporcionado a realização deste trabalho.

À minha orientadora, a Doutora Marta Abreu, pela disponibilidade, ajuda, orientação, incentivo, simpatia, boa disposição, sentido prático e pela disponibilização de informação e conhecimentos, indispensáveis à realização do estudo.

À minha coorientadora, Eng.^a Carla Alegria, pela ajuda no desenvolvimento dos ensaios experimentais, no tratamento de dados, correções, resolução de problemas, sugestões, simpatia e disponibilidade.

Ao departamento da microbiologia nas pessoas Dr.^a Cristina Aleixo e Dr.^a Márcia Reto pelo auxílio na componente microbiológica, na discussão de ideias e conclusões e pela sua boa disposição que permitiam um agradável ambiente nos laboratórios. Um especial agradecimento às técnicas superiores Maria do Carmo Paulo e Ana Magalhães pela orientação e ajuda na realização das análises microbiológicas e em diversos procedimentos laboratoriais.

Ao Instituto Superior de Agronomia, em especial à minha coorientadora Prof. Dr.^a Margarida Moldão-Martins, pela presença, orientação, apoio, simpatia e disponibilidade.

À Bárbara e à Margarida por me terem acompanhado, aturado, incentivado e mimado nesta etapa, sem elas não teria sido possível. Obrigado pela amizade, confiança e cumplicidade.

À Joana pela paciência, força, ajuda, confiança, incentivo, em todo o apoio indispensável, e novamente à paciência para me aturar naqueles momentos, obrigado.

Aos meus colegas e amigos, que me apoiaram e me ajudaram de alguma forma durante todo este período.

Agradeço aos meus pais e irmã, por tudo.

Resumo

Foram avaliados os efeitos singulares e integrados da aplicação de calor, ultrassons e biocontrole (*Blossom Protect*[™]) na conservação pós-colheita de pera Rocha e na aptidão do fruto para processamento mínimo. Na aplicação de calor (Top - imersão das peras em água) verificou-se que a condição de 40 °C / 40 min, selecionada por metodologia de superfícies de respostas, conduz à redução da microbiota inicial (~ 1 e $\sim 2 \text{ Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ para os microrganismos aeróbios a 30 °C e, bolores e leveduras, respetivamente) sem alterar as características sensoriais em fresco. A aplicação singular de ultrassons não afetou os níveis de contaminação inicial e não acrescentou qualquer efeito na combinação com o tratamento térmico. Durante a armazenagem pós-colheita (7 °C, 60 dias), os efeitos do Top na descontaminação inicial revelaram-se importantes no controlo da incidência de podridão dos frutos, não se verificando efeitos acrescidos na combinação com o biocontrole. No contexto do processamento mínimo o Top demonstrou potencialidades para descontaminar parcialmente a matéria-prima, em alternativa ao uso de hipoclorito de sódio, contribuindo em consequência para controlar o desenvolvimento microbiológico e, ainda para diminuir a suscetibilidade de escurecimento do fruto cortado durante a armazenagem com impacto favorável na aceitação sensorial do produto (5 °C, 15 dias).

Palavras-chave: pera Rocha, armazenagem, tratamento térmico, ultrassons, biocontrole, processamento mínimo.

Abstract

The integrated effects of heat treatments, ultrasound and biocontrol (*Blossom Protect*[™]) were evaluated as alternatives to postharvest storage of Rocha pear and to the production of fresh-cut pear. Based on response surface methodology to assess thermal binomials decontamination efficiency, the 40 °C / 40 min condition (Top - immersion the pears in water) was selected due to the achieved reduction level (~ 1 and ~ 2 LogCFU.g⁻¹ to aerobic microorganisms and yeast and molds, respectively) without changing the fresh characteristics. Ultrasound application had a non-significant effect in reducing fruits contaminating flora and didn't introduced further decontamination effects when combined with Top, confirming Top single application effectiveness. During fruit postharvest storage (7 °C, 60 days), the effects of the combination of heat treatment and biocontrol were surpassed by Top single application since the later proved to be more effective in achieving significant decontamination levels and to control rot development. Regarding the use of Top as an alternative treatment to the standard use of sodium hypochlorite as a decontamination agent, has shown potential in decontamination, effective control of microbial development and color maintenance of the fresh-cut pear during storage (5 °C, 15 days) suggest that Top is a viable alternative to this production.

Keywords: Rocha pear, storage, heat treatment, ultrasound, biocontrol, minimal processing.

Extended Abstract

Research was focused on the study of integrated alternative physical (heat and ultrasound) and biocontrol (*Blossom Protect*[™]: *Aureobasidium pullulans* yeast antagonist) treatments to improve Rocha pear quality during postharvest storage (7 °C, 60 days) and the effects of the best performing treatment as an alternative decontamination solution to sodium hypochlorite in quality of minimally processed Rocha pear in quarters during storage (5 °C, 15 days).

The 40 °C / 40 min heat treatment (Top - immersion the pears in water) was selected by response surface methodology based on the promoted effects regarding the (~1 and ~2 LogCFU.g⁻¹ to microorganisms 30 °C and yeast and molds, respectively) initial decontamination efficiency and achieved fruit color maintenance.

Ultrasound application (42 kHz, 40 min) had a non-significant effect in reducing fruits contaminating flora and did not introduced further decontamination effects when combined with Top, confirming Top single application effectiveness.

During fruit postharvest storage (7 °C, 60 days), the effects of the combination of heat treatment with biocontrol were surpassed by Top single application since the later proved to be more effective in achieving significant decontamination levels and to control rot development. The observed fast quality changes namely in color and firmness during postharvest were independent of applied treatment and could be justified by the accelerated storage conditions (7 °C) leaving unanswered the possible physiological benefits associated to heat treatment in the real storage conditions (0 °C).

As the best performing treatment, Top (40 °C / 40 min) was evaluated as an alternative raw material decontamination treatment to the standard post-cut use of sodium hypochlorite (HIPO). The heat treatment effects concerning Y&M decontamination efficiency (<10 CFU.g⁻¹) were significant and contributed to effectively control microbial development during storage (5 °C, 15 days) regarding HIPO where both mesophilic and Y&M counts were always higher (1 Log cycle; p<0,05). Top was also beneficial to promote color maintenance of the pear quarters during storage which is a critical factor to fresh-cut Rocha pear acceptability. Therefore, the 40 °C / 40 min heat treatment could be considered as a viable decontamination alternative to fresh-cut Rocha pear production with effects regarding browning prevention leading to product shelf-life extension.

Índice Geral

| | |
|---|-----------|
| Agradecimentos | i |
| Resumo | ii |
| Abstract..... | iii |
| Extended Abstract..... | iv |
| Índice Geral..... | v |
| Índice de Figuras | viii |
| Índice de Tabelas | x |
| Índice de Abreviaturas | xi |
| | |
| 1 Enquadramento Teórico | 1 |
| 2 Revisão Bibliográfica | 5 |
| 2.1 Pera Rocha | 6 |
| 2.1.1 Caracterização botânica e composicional..... | 6 |
| 2.1.2 Produção e comercialização | 8 |
| 2.2 Processos de alteração da qualidade na armazenagem pós-colheita..... | 9 |
| 2.2.1 Alterações fisiológicas | 9 |
| 2.2.2 Alterações microbiológicas | 11 |
| 2.3 Métodos de conservação pós-colheita | 12 |
| 2.3.1 Métodos “convencionais” | 12 |
| Refrigeração..... | 12 |
| Atmosfera controlada | 13 |
| Tratamentos químicos | 14 |
| 2.3.2 Métodos alternativos | 14 |
| Tratamentos térmicos moderados | 15 |
| Tratamentos não térmicos: ultrassons..... | 16 |
| Biocontrolo | 17 |
| 2.4 Hortofrutícolas minimamente processados | 18 |
| 2.4.1 Processamento mínimo..... | 18 |
| 2.4.2 Consequências do processamento mínimo na qualidade..... | 19 |
| 2.4.3 Conservação de produtos hortofrutícolas minimamente processados | 20 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3 | Desenvolvimento experimental | 22 |
| 3.1 | Materiais e procedimentos tecnológicos | 23 |
| 3.1.1 | Matéria-prima | 23 |
| 3.1.2 | Critérios de seleção da matéria-prima | 23 |
| 3.1.3 | Execução de tratamentos térmicos moderados | 23 |
| 3.1.4 | Execução de tratamentos de sonicação | 23 |
| 3.1.5 | Execução de tratamento de termossonicação | 23 |
| 3.1.6 | Execução de tratamento de biocontrole | 24 |
| 3.1.7 | Execução das operações de processamento mínimo | 24 |
| 3.2 | Métodos analíticos | 26 |
| 3.2.1 | Cor CIELab | 26 |
| 3.2.2 | pH e Teor em sólidos solúveis (TSS) | 27 |
| 3.2.3 | Perda de massa | 28 |
| 3.2.4 | Incidência de podridão visível | 28 |
| 3.2.5 | Firmeza | 28 |
| 3.2.6 | Conteúdo fenólico total (CFT) | 28 |
| 3.2.7 | Atributos microbiológicos | 29 |
| 3.2.8 | Análise sensorial | 29 |
| 3.3 | Métodos estatísticos | 30 |
| 3.3.1 | Análise de variância (ANOVA) | 30 |
| 3.3.2 | Metodologia de superfícies de resposta (RSM) | 30 |
| 3.4 | Resultados experimentais | 31 |
| 3.4.1 | Estudo de otimização da aplicação singular do tratamento térmico moderado | 32 |
| | Objetivo e delineamento experimental | 32 |
| | Resultados e discussão | 34 |
| | Conclusão | 46 |
| 3.4.2 | Estudo de avaliação dos efeitos da integração de tratamentos: térmico e sonicação | 47 |
| | Objetivo e delineamento experimental | 47 |
| | Resultados e discussão | 49 |
| | Conclusão | 51 |
| 3.4.3 | Estudo de avaliação dos efeitos da integração de tratamentos durante a armazenagem: térmico e biocontrole | 52 |
| | Objetivo e delineamento experimental | 52 |
| | Resultados e discussão | 54 |
| | Conclusão | 63 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4.4 | Estudo do tratamento térmico moderado na aptidão da matéria-prima para processamento mínimo | 64 |
| | Objetivo e delineamento experimental..... | 64 |
| | Resultados e discussão..... | 66 |
| | Conclusão | 71 |
| 4 | Conclusões gerais e perspectivas futuras | 73 |
| 5 | Referências bibliográficas | 76 |
| 6 | Anexos | I |
| | Anexo A - Tabelas referentes ao ensaio 3.4.1 | II |
| | Anexo B - Tabela referente ao ensaio 3.4.2 | V |
| | Anexo C - Tabelas referentes ao ensaio 3.4.3..... | VI |
| | Anexo D - Tabelas referentes ao ensaio 3.4.4..... | VIII |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Pera Rocha. | 6 |
| Figura 2 - Evolução da taxa respiratória de frutos climatéricos e não-climatéricos | 10 |
| Figura 3 - Quartos de pera Rocha. | 24 |
| Figura 4 - Esquema geral de preparação das amostras minimamente processadas. | 25 |
| Figura 5 - Representação dos três índices de avaliação da cor (L^* , <i>chroma</i> e hue).. | 26 |
| Figura 6 - Diagrama do delineamento experimental da aplicação de tratamentos térmicos moderados face a amostras de peras não tratadas (C). | 33 |
| Figura 7 - Superfície de resposta para o parâmetro L^* (projeção no ponto central). | 36 |
| Figura 8 - Superfície de resposta para o parâmetro a^* (projeção no ponto central). | 37 |
| Figura 9 - Superfície de resposta para o parâmetro TCD (projeção no ponto central). | 39 |
| Figura 10 - Superfície de resposta para o parâmetro firmeza (projeção no ponto central). ... | 40 |
| Figura 11 - Superfície de resposta para o parâmetro pH (projeção no ponto central). | 42 |
| Figura 12 - Superfície de resposta para a redução de Micro a 30 °C (projeção no ponto central). | 44 |
| Figura 13 - Superfície de resposta para o parâmetro B&L (projeção no ponto central). | 45 |
| Figura 14 - Diagrama do delineamento experimental da aplicação dos tratamentos: ultrassons (US), térmico (Top) e combinação (Top x US). | 48 |
| Figura 15 - Efeitos singulares e combinados dos tratamentos térmico e de sonicação nos atributos de cor a) tonalidade da carepa a^* e b) Índice de escurecimento da polpa WI. | 49 |
| Figura 16 - Efeitos singulares e combinados do tratamento térmico e de sonicação nas contagens de a) microrganismos aeróbios a 30 °C (Micro 30 °C) e de b) bolores e leveduras (B&L). | 51 |
| Figura 17 - Diagrama do delineamento experimental da aplicação de tratamentos: térmico (Top) e tratamento integrado com biocontrolo (Top x A) face a amostras de peras não tratadas (C). | 53 |
| Figura 18 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) na perda de massa, durante 60 dias de armazenamento (7 °C). | 54 |
| Figura 19 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) no atributo da tonalidade da carepa dos frutos, durante 60 dias de armazenamento (7 °C). | 55 |
| Figura 20 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) no atributo WI da polpa dos frutos, durante 60 dias de armazenamento (7 °C). | 56 |
| Figura 21 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) no atributo firmeza dos frutos, durante 60 dias de armazenamento (7 °C). | 57 |
| Figura 22 - Análise sensorial dos atributos cor, firmeza e apreciação global (C vs Top e Top x A) durante o armazenamento (60 dias, 7 °C). | 59 |
| Figura 23 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) na quantificação do teor de compostos fenólicos totais, durante 60 dias de armazenamento (7 °C). | 61 |

| | |
|--|----|
| Figura 24 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) na contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C e de bolores e leveduras, após tratamento.. | 62 |
| Figura 25 - Incidência de podridão visível (%) nas amostras tratadas (C vs Top, Top x A durante 60 dias de armazenagem (7 °C)). | 62 |
| Figura 26 - Diagrama do delineamento experimental da aplicação de tratamentos: térmico (Top) e hipoclorito de sódio (HIPO) no processamento mínimo de pera Rocha. | 65 |
| Figura 27 - Variação do índice de escurecimento (WI) das amostras de pera Rocha minimamente processadas (HIPO e Top) ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C). a) Superfície descascada dos quartos; b) Superfície cortada dos quartos. | 67 |
| Figura 28 - Análise sensorial dos atributos a) cor e b) apreciação global, das amostras de pera Rocha minimamente processada referente à superfície descascada (HIPO e Top) ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C). | 68 |
| Figura 29 - Variação da firmeza (pico de força máximo, N) das amostras de pera Rocha minimamente processadas (HIPO e Top) ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C). | 69 |
| Figura 30 - Variação do conteúdo fenólico total (CFT) das amostras de pera Rocha minimamente processadas (HIPO e Top) ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C). | 69 |
| Figura 31 - Contagens de microrganismos a 30 °C e de bolores e leveduras, na amostra controlo e nas amostras de pera Rocha minimamente processada (HIPO e Top), após processamento. | 70 |
| Figura 32 - Contagens de microrganismos aeróbios a 30 °C e de bolores e leveduras, nas amostras de pera Rocha minimamente processadas (HIPO e Top) ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C). | 71 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição média de pera. Valores expressos por 100 g de parte edível..... | 7 |
| Tabela 2 - Descrição geral das operações envolvidas no processamento mínimo. | 18 |
| Tabela 3 - Efeitos negativos do processamento mínimo na qualidade dos frutos minimamente processados e respetivas causas..... | 19 |
| Tabela 4 - Escala e respetivos descritores adotados na avaliação dos atributos sensoriais de pera Rocha inteira e minimamente processada..... | 30 |
| Tabela 5 - Matriz codificada e decodificada na otimização do tratamento térmico; (C - ponto central). | 32 |
| Tabela 6 - Valores médios (\pm DP) dos atributos físicos e microbiológicos referentes à matéria-prima (sem tratamentos) no tempo 0. | 34 |
| Tabela 7 - Coeficientes de regressão e respetivas probabilidades do modelo quadrático para o parâmetro L^* | 35 |
| Tabela 8 - Coeficiente de regressão e respetivas probabilidades do modelo quadrático para o parâmetro $^{\circ}h$ | 37 |
| Tabela 9 - Coeficientes de regressão e respetivas probabilidades do modelo quadrático para o parâmetro TCD..... | 38 |
| Tabela 10 - Coeficientes de regressão e respetivas probabilidades do modelo quadrático para o atributo firmeza..... | 40 |
| Tabela 11 - Valores médios de firmeza (\pm DP) para as condições de tratamentos testadas. | 41 |
| Tabela 12 - Coeficientes de regressão e respetivas probabilidades do modelo quadrático para o atributo pH..... | 42 |
| Tabela 13 - Valores médios de pH e TSS (\pm DP) para as condições de tratamentos testadas. | 43 |
| Tabela 14 - Coeficientes de regressão e respetivas probabilidades do modelo quadrático para a redução de Micro 30 $^{\circ}C$ | 44 |
| Tabela 15 - Coeficientes de regressão e respetivas probabilidades do modelo quadrático para a redução de B&L..... | 45 |
| Tabela 16 - Delineamento experimental do ensaio. | 47 |
| Tabela 17 - Registos médios (\pm DP) relativos ao atributo firmeza após tratamentos. | 50 |
| Tabela 18 - Registos médios (\pm DP) relativos ao atributo de pH e TSS após tratamentos. | 50 |
| Tabela 19 - Identificação das amostras e respetivos tratamentos..... | 52 |
| Tabela 20 - Registos médios (\pm DP) relativos aos atributos de pH e TSS durante o armazenamento (60 dias, 7 $^{\circ}C$)..... | 58 |
| Tabela 21 - Identificação das amostras e respetivos tratamentos..... | 64 |
| Tabela 22 - Resultados médios (\pm DP) de pH, TSS das amostras HIPO e Top ao longo da armazenagem (15 dias, 5 $^{\circ}C$)..... | 66 |

Índice de Abreviaturas

Listagem de abreviaturas utilizadas neste trabalho, organizadas alfabeticamente.

A – Antagonista comercial *Blossom Protect*TM

B&L – Bolores e Leveduras

C – Controlo

ca – cerca (*circa*)

cf – conforme

CFT – Compostos fenólicos totais

DP – Desvio padrão

e.g. – Por exemplo (*exempli gratia*)

g – Força gravítica

Eq. – Equação

GRM – Modelos Gerais de Regressão (General Regression Models)

h – Hora

HF – Hortofrutícolas

HMP – Hortofrutícolas minimamente processados

Id. – Identificação

HIPO – Tratamento com hipoclorito de sódio

Micro 30 °C – Microrganismos aeróbios totais a 30 °C

min – Minuto

MP – Matéria-prima

mp – Minimamente processado

PVU – Período de vida útil

RSM – Metodologia de superfícies de resposta (Response surface methodology)

t – Tempo

T – Temperatura

TCD – Diferença total de cor (Total color difference)

TSS – Teor de sólidos solúveis

Top – Tratamento térmico otimizado

Top x A – Tratamento térmico otimizado combinado com antagonista

UFC – Unidade(s) formadora(s) de colônia(s)

US – Ultrassons

vs – em oposição (*versus*)

WI – Índice de Escurecimento (Whiteness Index)

1 Enquadramento Teórico

Os novos modelos de produção atualmente utilizados nos pomares permitem alcançar níveis elevados de produtividade. Contudo, perturbações pós-colheita provocadas por agentes bióticos e abióticos, destacando-se o escaldão enquanto principal desordem fisiológica, implicam elevadas perdas sendo o respetivo controlo investigado a nível mundial. As alterações fisiológicas para além de contribuírem em muito para perdas de massa, implicam variações significativas da composição fitoquímica (e.g. vitaminas e compostos fenólicos) e das características sensoriais, com especial relevo para a componente aromática, bem como da aptidão dos frutos para a transformação tecnológica.

As condições de armazenagem no período pós-colheita são fundamentais para garantir a qualidade intrínseca dos frutos bem como a sua aptidão para o processamento. Intervenções a este nível contribuem de forma efetiva para a redução de perdas, aumentando a competitividade deste segmento de mercado, procurando em simultâneo atender às necessidades e requisitos tecnológicos dos agentes produtivos, bem como, contribuir para garantir a qualidade exigida pelo consumidor atual.

Na Europa estão referenciados como principais patogénicos que causam importantes perdas pós-colheita em pomóideas os fungos *Penicillium expansum* e *Phlyctema vagabunda* (Mari *et al.*, 2010). O desenvolvimento de fungos de várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoschlamys* pode ainda ser responsável pela produção da micotoxina patulina, cuja presença não é eliminada pelo processamento dos frutos.

Existem vários métodos, de aplicação singular ou integrada, para controlar as doenças pós-colheita de frutos (Benato *et al.*, 2001). O controlo dos problemas microbiológicos e fisiológicos tradicionalmente resume-se à aplicação de fungicidas e antioxidantes de síntese, para além do recurso à refrigeração e atmosferas controladas convencionais.

Com a proibição do uso de produtos antioxidantes para o controlo do escaldão, entre os quais o produto mais comum e eficaz a difenilamina (DPA) (Diretiva 91/414/CEE; Diretiva 2009/859/CE), a investigação tem vindo a centrar-se na conservação com níveis reduzidos de oxigénio em atmosferas controladas dinâmicas, demonstrando um controlo efetivo em algumas variedades identificadas como suscetíveis ao escaldão. Os resultados evidenciam contudo que os protocolos a seguir para implementação desta tecnologia dependem da variedade e das condições de crescimento dos frutos nas zonas de produção (Prange *et al.*, 2010). Esta tecnologia necessita, contudo, de ser ajustada a cada variedade, de forma a otimizar a sua conservação e a assegurar o controlo do escaldão.

De uma forma geral, a aplicação singular de antagonistas (biocontrolo) não permite a diminuição total de doenças pós-colheita, pelo que a utilização combinada com outros

tratamentos é importante para aumentar o respetivo desempenho (Leverentz *et al.*, 2000; Spotts *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2004; El Ghaouth *et al.*, 2004). Neste âmbito existem várias metodologias que podem ser testadas singularmente ou em combinação com o biocontrolo, nomeadamente, a utilização de tratamentos físicos como a aplicação de calor, ultrassons a radiação UV-C e também a utilização de revestimentos comestíveis como importantes exemplos.

A aplicação de tratamentos térmicos moderados tem sido uma metodologia utilizada para induzir alterações benéficas no comportamento fisiológico dos frutos durante o período pós-colheita (Lurie, 1998), para além de exercerem controlo de infestações bem como a prevenção da deterioração por fungos. Estes tratamentos envolvem a aplicação de calor por imersão dos produtos em água, vapor ou contacto com correntes de ar quente. A gama de intensidade térmica aplicada com benefícios na retenção de fatores da qualidade é muito variável, incluindo a utilização de temperaturas inferiores a 50 °C para uma gama alargada de tempos de tratamento (segundos a horas) e temperaturas da ordem de 90°-95 °C durante segundos. A multiplicidade de binómios tempo-temperatura possíveis é limitada pela promoção dos efeitos pretendidos na qualidade dos produtos, sem induzir danos pelo calor (Lurie, 1998). As respostas fisiológicas induzidas pelos tratamentos são igualmente dependentes das cultivares, local de produção, práticas agrícolas e estado de maturação (Fallik, 2004). Em maçãs, a aplicação do tratamento térmico de intensidade 38 °C / 4 dias, contribuiu favoravelmente para a redução da deterioração dos frutos provocada por *Penicillium expansum* ao longo de 6 meses de armazenagem (0 °C) (Sams *et al.*, 1993). A deterioração provocada pelo *Botrytis cinerea* Pers. ou pelo *P. expansum* foi parcialmente controlada durante o armazenamento de maçãs Golden delicious submetidas a um tratamento térmico equivalente (Fallik *et al.*, 1995; Klein *et al.* 1997).

Leverentz *et al.*, (2000) demonstraram que a aplicação integrada de um tratamento térmico (38 C / 4 dias) com a aplicação de um antagonista (*Pseudomonas syringae*) foi responsável pela prevenção de podridão em maçãs Gala durante a armazenagem pós-colheita (1 °C / 3 meses).

Estudos desenvolvidos por membros da equipa orientadora deste trabalho demonstraram que tratamentos térmicos aplicados a frutos com, maçã, pera, kiwi ou pêssago melhoram a aptidão dos mesmos à transformação para processamento mínimo (Abreu *et al.*, 2003).

A sonicação envolve a utilização de ondas sonoras de alta frequência (20 to 100 kHz) e tem sido avaliada como potencial metodologia de inativação de microrganismos (Piyasena *et al.*, 2003). O efeito letal dos ultrassons sobre os microrganismos é atribuído ao efeito de

cavitação, fenómeno através do qual se verifica a formação, crescimento e colapso de bolhas, que geram energia mecânica e química localizada (Gogate e Kabadi, 2009). A cavitação gera condições localizadas de temperatura e de pressão elevadas denominadas de “hot spots”, bem como a libertação de radicais livres gerados em função da dissociação de vapores presos nas bolhas. A cavitação também gera turbulência localizada e microcirculação de líquidos. Todos estes efeitos promovidos pela cavitação contribuem para a ação de limpeza das superfícies (Gogate e Kabadi, 2009).

Para o estudo de metodologias alternativas na conservação de pera rocha inteira e respetiva aptidão para processamento mínimo foram testados os efeitos singulares e combinados de tratamentos pós-colheita, físicos e biológicos, nomeadamente através da aplicação de calor moderado, ultrassons e biocontrolo. O cumprimento deste objetivo compreendeu a realização dos seguintes estudos:

- Estudo de otimização da aplicação singular do tratamento térmico moderado;
- Estudo de avaliação dos efeitos da integração de tratamentos: térmico e sonicação;
- Estudo da avaliação dos efeitos da integração de tratamentos durante a armazenagem: térmico e biocontrolo;
- Estudo do tratamento térmico moderado na aptidão da matéria-prima para processamento mínimo.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Pera Rocha

2.1.1 Caracterização botânica e composicional

A pera (*Pyrus communis* L.) é o fruto de uma árvore pertencente à família *Rosaceae*, sub-família *Pomoideae*. A pera Rocha é uma variedade com Denominação de Origem Protegida (DOP), o que certifica esta variedade como rustica e com características organoléticas únicas, sendo a sua produção realizada de acordo com as regras estipuladas no caderno de especificações nomeadamente no que respeita às condições de produção, condução dos pomares, colheita e acondicionamento (Soares *et al.*, 2003; ANP, 2012). De acordo com o Despacho nº 50/94 de 20-01-94, a área geográfica de produção inclui os concelhos de Sintra, Mafra, Arruda dos Vinhos, Sobral de Monte Agraço, Alenquer, Vila Franca de Xira, Azambuja, Torres Vedras, Cartaxo, Lourinhã, Bombarral, Cadaval, Santarém, Rio Maior, Peniche, Óbidos, Caldas da Rainha, Torres Novas, Alcanena, Alcobaça, Nazaré, Porto de Mós, Batalha, Tomar, Ferreira do Zêzere, Vila Nova de Ourém, Leiria, Marinha Grande e Pombal, sendo a região Oeste aquela de maior expressividade, representando cerca de 90% da produção nacional.

A pera Rocha (Figura 1) é um fruto partenocárpico cuja forma é predominantemente oblonga, piriforme, ovada, com cor amarela clara, pigmentação homogénea e com carepa típica unida na base e dispersa por toda a superfície. A polpa caracteriza-se pela sua cor branca, macia, granulosa, doce, não ácida, muito succulenta e de perfume ligeiramente acentuado.



Figura 1 - Pera Rocha. (Fonte: Agrotec, s.d)

De acordo com a forma, estado de maturação, cor da casca e calibre, a pera Rocha pode ser classificada em três categorias: Extra – com qualidade superior em que os frutos apresentam forma, desenvolvimento e coloração típicos e são providos de pedúnculo intacto; Categoria I – frutos de boa qualidade (características típicas) em que se admite ligeiros defeitos ao nível da forma, desenvolvimento e coloração; Categoria II – frutos não classificados nas categorias anteriores, mas mantenham minimamente as características da

variedade incluindo a ausência de pedúnculo desde que não se verifique deterioração da epiderme.

Na generalidade, a pera apresenta elevados teores de água (ca de 80%), sendo a sua composição química variável e dependente de fatores como: variedade, práticas agrícolas, data de colheita e estado de desenvolvimento. Na Tabela 1 encontra-se sumariada a composição química e nutricional média por 100 g de pera.

Tabela 1 - Composição média de pera. Valores expressos por 100 g de parte edível.

| Designação | Quantidade | Unidade |
|-------------------------------|------------|---------|
| Valor energético | 58 | kcal |
| Água | 83,71 | g |
| Proteína | 0,38 | g |
| Lípidos Totais | 0,12 | g |
| Ác. gordos saturados | 0,006 | g |
| Ác. gordos mono-insaturados | 0,026 | g |
| Ác. gordos poli-insaturados | 0,029 | g |
| Glúcidos | 15,46 | g |
| Fibra total dietética | 3,1 | g |
| Sacarose | 0,78 | g |
| Glucose | 2,76 | g |
| Frutose | 6,23 | g |
| Cinza | 0,33 | g |
| Minerais | | |
| Cálcio | 9 | mg |
| Ferro | 0,17 | mg |
| Magnésio | 7 | mg |
| Fósforo | 11 | mg |
| Potássio | 119 | mg |
| Sódio | 1 | mg |
| Zinco | 0,10 | mg |
| Cobre | 0,082 | mg |
| Manganésio | 0,049 | mg |
| Flúor | 2,2 | µg |
| Selénio | 0,1 | µg |
| Vitaminas | | |
| Vitamina C | 4,2 | mg |
| Tiamina | 0,012 | mg |
| Riboflavina | 0,025 | mg |
| Niacina | 0,157 | mg |
| Vitamina E (alpha-tocopherol) | 0,12 | mg |
| Vitamina K (phyloquinone) | 4,5 | µg |
| Outros | | |
| b-caroteno | 13 | µg |
| b-criptoxantina | 2 | µg |
| Luteína + Zeaxantina | 45 | µg |

(adaptado de <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/pear.>)

De acordo com a sua composição e à semelhança da maioria dos frutos, a pera, para além da sua natureza diurética, é considerada como uma boa fonte de energia dado o seu conteúdo em glúcidos (cerca de 15%). Acresce que também é uma importante fonte de fibra solúvel pela sua riqueza em pectina. Para além da predominância de vitamina C ($4,2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), a pera apresenta igualmente na sua composição fitoquímicos de interesse pela sua capacidade antioxidante (Brewer, 2011) como são exemplo a vitamina E e compostos fenólicos, como o ácido clorogénico e os taninos (responsáveis pela suave adstringência). De facto, estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo elevado destes alimentos, pela sua composição fitoquímica, apresentam como benefício potencial a prevenção de doenças crónicas não transmissíveis (DCNT) tais como aterosclerose, diabetes e cancro (Hung *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007; Kunchit *et al.*, 2013;).

2.1.2 Produção e comercialização

De todas as variedades de pera produzidas nacionalmente, a pera Rocha é sem dúvida a mais importante a nível comercial representando cerca de 97% da produção total. A representatividade da região Oeste na produção da pera Rocha (cerca de 90%) justifica-se pelas condições edafoclimáticas mais favoráveis nesta região para a respetiva produção. A colheita dos frutos, definida por índices de maturação, é iniciada quando os frutos apresentam uma dureza da polpa entre 5,5 e 6,5 $\text{kg} \cdot 0,5 \text{ cm}^{-2}$, valores de teor de sólidos solúveis entre 11 e 13 °Brix (índice refratométrico) e acidez entre 2 a 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido málico (ANP, 2012). Por norma, estes índices de maturação e para a região Oeste são obtidos em início de Agosto estendendo-se as campanhas até finais de Setembro com verificação do pico produtivo em Agosto.

Já a comercialização desta variedade tem início em meados de Agosto e decorre habitualmente até finais de Abril dada a capacidade de conservação dos frutos (Anuário Agrícola, 2013) e recurso a tecnologias de conservação (e.g. câmaras de atmosfera controlada) que permitem a manutenção da qualidade dos frutos e a maximização do período de armazenagem pós-colheita. Desta forma reúnem-se igualmente condições que facilitam a exportação a longas distâncias.

Da produção de pera Rocha, estima-se cerca de 70% seja escoada no mercado nacional sendo a restante produção destinada à exportação. Como principais mercados de exportação, países como Brasil, Reino Unido e França figuram como aqueles de maior cota quer pela regularidade como pelas quantidades envolvidas (Anuário Agrícola, 2003).

2.2 Processos de alteração da qualidade na armazenagem pós-colheita

No decorrer da armazenagem pós-colheita, os hortofrutícolas (HF) verificam a continuidade dos processos fisiológicos como a respiração, produção de etileno e transpiração. A contínua evolução destas reações implica alterações sensoriais dos HF, nomeadamente ao nível da cor, sabor e textura e também no aroma (Kader, 1999; Saltveit, 2004). A acrescer a esta alteração, o desenvolvimento de doenças pós-colheita (com origem microbiológica) que podem ocorrer, comprometem igualmente a qualidade do produto conduzindo, a consequências graves na margem de comercialização das matérias-primas.

2.2.1 Alterações fisiológicas

As necessidades energéticas dos HF durante o período pós-colheita são supridas pela respiração aeróbica, processo oxidativo de quebra de substâncias de reserva (macromoléculas como o amido, açúcares e ácidos orgânicos) em moléculas mais simples (fonte de carbono para a síntese de outro compostos) com libertação de energia. Este processo, no entanto, induz a senescência dos tecidos vegetais, situação em que se verifica uma predominância de reações degradativas. A atividade respiratória varia de acordo com a espécie vegetal, variedade e estado de maturação, sendo igualmente influenciada por fatores externos como temperatura, composição da atmosfera envolvente, humidade relativa e injúrias (danos) a que os HF sejam sujeitos durante o manuseamento dos mesmos.

Considera-se que o metabolismo respiratório dos HF tem implicações importantes para a armazenagem pós-colheita sendo tido como um indicador da atividade fisiológica dos mesmos e diretamente proporcional à perecibilidade do produto (Moldão e Empis, 2000; Saltveit, 2004), isto é, quanto mais elevada for a intensidade respiratória do HF menor será o período de vida útil. Assim, os HF podem ser classificados de acordo com a respetiva intensidade respiratória e, no caso particular da pera, este fruto é considerado como apresentando uma taxa respiratória moderada, com um valor entre 10 e 20 mg de CO₂ libertado.(kg.h)⁻¹ (a 5 °C) (Almeida, 2005).

De um modo geral, a intensidade respiratória dos HF diminui ao longo do período de crescimento, desenvolvimento e maturação (Figura 2). De acordo com este padrão respiratório, e no caso particular dos frutos, distinguem-se dois comportamentos respiratórios designando-se os frutos como não-climatéricos ou climatéricos. Nos frutos não-climatéricos, após um rápido declínio na taxa respiratória durante as fases de crescimento e desenvolvimento, as modificações associadas à maturação são lentas mantendo os níveis de decréscimo na fase de senescência. No caso dos frutos climatéricos, como é exemplo a

pera, após a descida acentuada da taxa respiratória durante as fases de crescimento e desenvolvimento dos frutos, verifica-se um máximo de respiração (pico climatérico) na fase de maturação, a que se segue de uma descida acentuada determinando a senescência. A aproximação ao pico climatérico corresponde a um estado de maturação considerado ideal para efeitos de colheita por os frutos se encontrarem ainda numa fase de maturação prévia à desejada para o consumo em fresco.

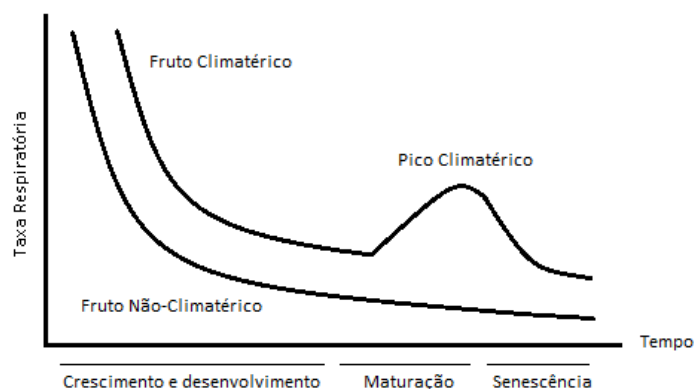


Figura 2 - Evolução da taxa respiratória de frutos climatéricos e não-climatéricos.
(adaptado de <http://www2.spi.pt/documents/books/hortofruticolas>)

Nesta fase (climatérica), os frutos iniciam uma série de processos bioquímicos que estimulam o amadurecimento e de entre os quais se destaca o metabolismo do etileno. O etileno (C_2H_4) é uma fitohormona cuja síntese, à semelhança da taxa respiratória, depende do HF e variedade em questão, do estado de maturação e de fatores externos (e.g. temperatura, composição da atmosfera, humidade relativa e injúrias).

O metabolismo do etileno tem efeitos ao nível do desenvolvimento e maturação dos HF e cuja taxa de produção tem igualmente implicações ao nível da conservação pós-colheita. De facto, o aumento da produção de etileno induz alterações fisiológicas marcadas nos HF, conducentes à senescência nomeadamente pela estimulação da taxa respiratória (Watada *et al.*, 1990).

Neste sentido, o conhecimento da suscetibilidade dos HF ao etileno é essencial em termos da armazenagem pós-colheita, principalmente no caso de HF climatéricos, tornando-se necessário separar variedades produtoras de etileno de variedades suscetíveis. Estima-se para a pera uma taxa de produção de etileno entre 10 e os 100 $\mu LC_2H_4.(kg.h)^{-1}$ (Almeida, 2005) reconhecendo-se ainda a sua suscetibilidade a esta hormona. Desta forma, e para efeitos de conservação pós-colheita, sugere-se a utilização de absorvedores de etileno nas câmaras, atrasando assim aumentos na taxa respiratória e a senescência dos frutos.

Outro processo fisiológico de interesse no período pós-colheita dos HF é a transpiração, processo físico de perda de água (através dos estomas) para a atmosfera envolvente, sendo identicamente dependente dos fatores acima referidos. Este processo tem também implicações ao nível da qualidade sensorial (perda de turgescência dos tecidos vegetais) e nutricional das matérias-primas mas a principal implicação refere-se à perda de massa registada na armazenagem prolongada com consequências ao nível do rendimento diminuindo a margem de comercialização. No caso particular da pera, com um coeficiente de transpiração entre 10 e os 144 mg (kg.s.MPa)⁻¹, recomenda-se a manutenção dos frutos a 0 °C com uma humidade relativa (HR) na ordem dos 95% como forma de minimizar esta alteração fisiológica (Almeida, 2005).

Com efeito, estas condições de armazenagem (0 °C; 95% HR) atrasam as reações fisiológicas da pera e permitem, em condições de atmosfera normal, um período de armazenagem de cerca de 4-5 meses (ANP, 2012). Este período pode ainda ser aumentado (ordem de 9-10 meses) caso se recorra à armazenagem dos frutos em câmaras de atmosfera controlada com teores de oxigénio de 2 a 2,5% e de dióxido de carbono entre 0,5 a 0,7% (ANP, 2012).

2.2.2 Alterações microbiológicas

De entre os aspetos que alteram a fisiologia dos HF (respiração, produção de etileno e transpiração), as injúrias físicas são particularmente danosas na medida em que, ao permitir o contacto entre enzimas e substratos, induzem alterações significativas da qualidade em fresco dos HF. Esta situação compromete ainda o controlo do desenvolvimento microbiano já que favorece a disponibilidade de nutrientes.

Neste campo, e focando particularmente à pera, as doenças de pós-colheita incorrem em grandes prejuízos, aumentando os custos e, eventualmente, reduzindo as mais-valias na cadeia de conservação, armazenamento e distribuição (Fialho e Silva, 2010). O período de armazenamento e comercialização da pera pode de facto ser consideravelmente reduzido pelo desenvolvimento de doenças de pós-colheita sendo o grupo dos fungos os principais responsáveis.

Os sintomas da doença (podridões) são manifestados durante a armazenagem pós-colheita mas a infeção dos frutos pelos patogénicos pode ocorrer ao nível pré-colheita, durante a colheita (manuseamento e acondicionamento) ou mesmo no período de armazenagem. As doenças de pós-colheita de pera podem assim ser categorizadas em duas classes, uma relativa à infeção fúngica latente com origem no pomar, e outra relativa à infeção durante o

manuseamento pós-colheita. As primeiras são causadas pelos fungos *Sphaeropsis pyriputrescens*, *Potebniamyces pyri*, *Neofabraea* spp. e as segundas atribuídas ao desenvolvimento de *Mucor piriformis*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium* spp., principalmente por *P. expansum* (Xiao, 2005). Destas, refere-se que no caso particular da pera Rocha, a podridão provocada por *P. expansum*, designada por podridão azul, é reconhecida como aquela de maior frequência e grau de incidência durante a armazenagem pós-colheita (Sousa e Sousa, 2005; Nunes, 2011).

As podridões verificadas no âmbito pós-colheita podem alcançar 5-25% da produção total em países desenvolvidos (Finger e Corrêa, 2008; Sánchez e Barreiro, 2012). Desta forma é importante que, para frutos destinados a uma armazenagem prolongada, seja controlada a deterioração resultante dado que um único fruto pode, comprometer a qualidade de uma quantidade substancial de frutos armazenados numa mesma câmara (Xiao, 2005). Estas doenças podem no entanto ser prevenidas pela aplicação de tratamentos pós-colheita como a utilização de fungicidas sintéticos, no caso imazalil (de acordo com o caderno de especificações) (Oliveira, 2007; ANP, 2012).

2.3 Métodos de conservação pós-colheita

Os principais objetivos das tecnologias pós-colheita são os de manter a qualidade dos HF (sensorial, nutricional e microbiológica) e de reduzir as perdas quantitativas entre a colheita e o consumo dos mesmos. Estes objetivos são alcançados pelo manuseamento eficiente dos produtos após a colheita e pela aplicação de tecnologia adequada. Desta forma, o princípio da conservação baseia-se na utilização de múltiplas “barreiras” a níveis que não comprometam as características do HF em fresco e que retardem as reações de degradação. Ou seja, envolve a utilização de tecnologias que condicionam o metabolismo dos HF e o desenvolvimento microbiológico durante o período de armazenagem.

2.3.1 Métodos “convencionais”

Refrigeração

Entre as tecnologias disponíveis para o efeito, a temperatura é geralmente o fator ambiental mais importante, quando se refere à qualidade pós-colheita de HF (Watada e Qi, 1999). O recurso a baixa temperatura (refrigeração) permite atuar em ambas as vertentes de degradação da qualidade indicadas, isto é, no atraso da fisiologia e na prevenção do desenvolvimento microbiológico acelerado.

No entanto, é essencial o conhecimento da resistência dos HF à temperatura por forma a prevenir injúrias pelo frio (“chilling injuries”). Estas são responsáveis pela indução de distúrbios fisiológicos com implicações ao nível do escurecimento dos tecidos e apenas são percebidas após retirar os HF das câmaras. No caso particular da pera, estas injúrias são vulgarmente manifestadas pelo escurecimento verificado na cavidade central e que se estende pela polpa (“brown heart”), sendo passíveis de ocorrer quando em situações de e.g. temperatura não controlada (acima do ponto de congelação mas abaixo da adequada para a armazenagem de 0 °C).

Acresce ainda que a manutenção de baixa temperatura não controla na totalidade o desenvolvimento de podridões sendo recomendada a sua utilização combinada com a aplicação de fungicidas (Senhor *et al.*, 2009). Esta situação decorre do facto de o efeito inibidor da temperatura sobre os patogénicos ser variável e, relativo aos patogénicos identificados em pera, o fungo *Botrytis cinerea* tem capacidade de se desenvolver à temperatura de 0 °C (temperatura recomendada durante o pós-colheita da pera Rocha).

Atmosfera controlada

Outra tecnologia vulgarmente utilizada no âmbito do período pós-colheita de HF refere-se à armazenagem em condições de atmosfera controlada (CA). Durante a armazenagem e dada a continuidade dos processos fisiológicos, a atmosfera das câmaras sofre alterações na sua composição, nomeadamente a redução da concentração de O₂ e aumento da concentração de CO₂. Assim, o controlo das concentrações gasosas no interior das câmaras de armazenagem dos HF permite atrasar o respetivo amadurecimento sendo possível observar este efeito ao nível da cor, firmeza, taxa respiratória e teor de sólidos solúveis (Senhor *et al.*, 2009).

A pera Rocha é sensível à ação do dióxido de carbono sendo que concentrações deste gás acima de 1,2% favorecem distúrbios fisiológicos manifestados pela formação de “cavernas” na polpa dos frutos. Desta forma, para esta variedade, são utilizadas concentrações gasosas na ordem dos 2,0-2,5% para o O₂ e 0,5-0,7% para o CO₂, condições que permitem atrasar a fisiologia dos frutos (ANP, 2012).

No entanto, torna-se necessário avaliar os efeitos da alteração da atmosfera no desenvolvimento microbiológico. Reconhece-se o efeito bacteriostático deste tipo de alteração da atmosfera gasosa no interior das câmaras (elevadas concentrações de CO₂ e baixas concentrações de O₂), no entanto este é dependente do microrganismo em questão, da concentração gasosa efetiva e tolerância do HF à alteração da atmosfera (Porte e Maia,

2001). Este efeito refere-se maioritariamente à interferência do CO₂ no metabolismo dos microrganismos, atuando sobre o aumento da fase lag, verificando-se maior sensibilidade no que respeita às bactérias psicrótróficas (*Pseudomonas* sp.) e bolores (Porte e Maia, 2001).

Tratamentos químicos

O controlo das podridões durante o pós-colheita é geralmente conseguido com recurso a tratamentos químicos com fungicidas. Este método é de uso relativamente simples em comparação com outros métodos sendo reconhecido como efetivo (Prestes, 2003). Fungicidas de ação específica como o Imazalil (aplicável em pera Rocha), atuam sobre a estrutura das membranas alterando a sua permeabilidade, vulnerabilizando assim os patogénicos. O fungicida Imazalil figura como potencialmente eficaz para controlar *Penicillium expansum*, responsável pela podridão azul em pera Rocha, mesmo em baixas concentrações (Costa e Veiga, 1996).

Outro tratamento químico utilizado na armazenagem de pera Rocha diz respeito ao uso de antioxidantes. Estes visam retardar / inibir a desordem fisiológica designada por "escaldão superficial", isto é, o aparecimento de manchas acastanhadas na superfície dos frutos e de textura áspera que podem surgir após três meses de armazenagem nas condições já referidas. Até recentemente (campanha de 2012), os frutos eram tratados com difenilamina (DPA), com efeitos significativos no potencial de conservação da pera Rocha. No entanto, a utilização deste antioxidante foi proibida na União Europeia (Diretiva 2009/859/CE) com impactos significativos e conducente a prejuízos para os produtores de pera Rocha e centrais fruteiras uma vez que diminui o período de armazenagem (ANP, 2009).

Neste sentido, surge a necessidade de desenvolver estratégias de conservação alternativas para a pera Rocha já que a acrescer à proibição do DPA, estão associados problemas ambientais e de risco químico para os consumidores, cada vez mais exigentes. Assim, o estudo de diversas estratégias tais como a aplicação de tratamentos físicos como a aplicação de calor e/ou ultrassons bem como o biocontrolo constituem alternativas viáveis ao uso excessivo dos pesticidas de síntese e de antioxidantes (Robiglio *et al.*, 2011).

2.3.2 Métodos alternativos

A aplicação de calor moderado, de ultrassons e o biocontrolo são metodologias que têm vindo a ser desenvolvidas no âmbito do prolongamento do período pós-colheita de HF. Estas abordagens têm sido testadas com o objetivo de controlar a qualidade dos produtos

diminuindo a dependência de utilização de químicos de síntese para o controlo da fisiologia e podridões.

Tratamentos térmicos moderados

A aplicação de tratamentos térmicos moderados (TTM), isto é tratamentos que implicam a aplicação de calor a temperaturas inferiores a 50 °C, tem sido um método utilizado para induzir alterações fisiológicas nos HF durante o período pós-colheita. Estes tratamentos, aplicados sob a forma de imersão dos frutos em banhos, correntes de ar ou vapor, permitem ainda controlar o desenvolvimento de podridões e infestações de insetos permitindo a manutenção da qualidade no pós-colheita. Os TTM revelam-se assim como uma alternativa à aplicação de fungicidas e antioxidantes, já que se trata de um tratamento físico sem fazer uso de químicos de síntese, com a vantagem de não produzir resíduos (Lurie, 1998; Paull e Chen, 2000; Fallik, 2004).

Entre os efeitos benéficos da aplicação de TTM para a manutenção da qualidade, incluem-se a manutenção da firmeza dos tecidos, a diminuição da suscetibilidade às lesões causadas pelo frio, a diminuição da incidência e da intensidade de danos patológicos e o atraso nos fenómenos de maturação e senescência (Lurie, 1998). No entanto, estes tratamentos necessitam de otimização dos binómios tempo-temperatura dado que a tolerância aos TTM depende muito do tipo de HF verificando-se ainda pouca informação relativa às intensidades térmicas mais adequadas sem que o mesmo sofra consequências negativas.

Ao nível do metabolismo dos HF, os mecanismos que estão na base da resposta aos TTM não se encontram ainda totalmente descritos, no entanto referem-se os seguintes aspetos comuns:

- i) Na indução de síntese de proteínas de choque térmico (“heat shock proteins-HSP”). De acordo com Lurie (1998), a síntese destas proteínas está associada ao processo de termotolerância dos HF. Este processo induzido depende da temperatura de exposição dos produtos, existindo um limite a partir do qual pode, inversamente ocorrer a inibição da transcrição das referidas proteínas;
- ii) Na prevenção da perda de eletrólitos dos tecidos vegetais;
- iii) Na ativação da pectinametilesterase (PME) propiciada pela temperatura dos tratamentos, vulgarmente próxima da ótima para esta enzima. O aumento da atividade desta enzima permite a formação de pectatos de cálcio a partir do

cálcio endógeno e de pectinas de baixo metoxilo, o que poderá contribuir para o reforço da parede celular e consequentemente para a manutenção da firmeza dos tecidos vegetais;

- iv) Na inibição de enzimas envolvidas em processos de oxidação responsáveis pelo escurecimento, nomeadamente polifenoloxidasas (PPO) e peroxidases (POD);
- v) Na alteração do padrão respiratório. Este efeito é dependente de vários fatores (e.g. condições pré-colheita, a idade fisiológica e a intensidade do tratamento) e, de acordo com Lurie (1998), pode verificar-se um aumento da taxa respiratória durante a aplicação do tratamento, diminuindo com o período de exposição ou mesmo cessar. No entanto e na generalidade, após o tratamento verifica-se a diminuição da taxa respiratória relativamente aos hortofrutícolas não tratados.

Da mesma forma, os TTM apresentam efeitos ao nível do controlo das podridões que se desenvolvem na armazenagem pós-colheita pela conhecida sensibilidade de bolores ao calor (Breidt e Costilow, 2004). No entanto, reconhece-se que temperaturas acima dos 60 °-70 °C geralmente conduzem à eliminação de bolores podendo esta condição induzir danos pelo calor nos HF. Desta forma, esta metodologia pode assim ser pensada em combinação com outras que possibilitem a aplicação de intensidades térmicas inferiores, nomeadamente a sua combinação com ultrassons (termossonicação).

Tratamentos não térmicos: ultrassons

O recurso a ultrassons no âmbito da armazenagem pós-colheita é pensado com o objetivo de facilitar a descontaminação dos HF. Para efeitos de descontaminação, o mecanismo de ação dos ultrassons prevê a utilização de ondas sonoras de alta frequência, de 20 kHz a 10 MHz, que provocam o fenómeno de cavitação, isto é, formação de “micro bolhas”. Este fenómeno, a nível localizado, é conducente à elevação da pressão interna provocando o colapso das bolhas com promoção da disrupção das células bacterianas (Raso *et al.*, 1998; Piyasena *et al.*, 2003).

No entanto, a eficiência de descontaminação associada a esta metodologia é dependente de fatores como, a amplitude das ondas de ultrassons, o tempo de exposição, o tipo de microrganismos, a composição e estrutura do alimento e a temperatura de processamento (Jeng *et al.*, 1990). A intensidade do tratamento de ultrassons que permite alcançar a inativação de microrganismos, verifica a libertação de energia sob a forma de calor e aumento de pressão durante o tratamento. Esta situação pode assim comprometer a qualidade sensorial dos produtos, pelo que a aplicação desta metodologia é realizada a

frequências inferiores às necessárias para promover a inativação dos microrganismos. Assim, esta metodologia utiliza uma gama de frequência de 20 a 40 kHz (em meio líquido), o que permite libertar os microrganismos das superfícies dos produtos e induzir a permeabilidade das membranas microbianas, não os destruindo. Desta forma, a sua aplicação é prevista em combinação com outros tratamentos (e.g. térmico, altas pressões, químicos), podendo esta beneficiar de efeitos aditivos e/ou sinérgicos (Seymour *et al.*, 2002; Piyasena *et al.*, 2003).

Biocontrolo

Assiste-se nos últimos anos progressos significativos no biocontrolo como método alternativo aos fungicidas de síntese para prevenir podridões na armazenagem pós-colheita de pomóideas (Wilson *et al.* 1991; Oliveira, 2007). A nível mundial, a utilização de microrganismos antagonistas como “fungicidas vivos” representa ainda uma pequena fração dos fungicidas comercializados, encontrando-se apenas algumas formulações disponíveis. Apesar de apresentarem uma elevada especificidade, em comparação com os fungicidas de síntese de espectro mais alargado, a sua aplicabilidade é mais limitada considerando que a eficiência dos agentes antagonistas para sobreviver, colonizar e se multiplicar pode ser condicionada por fatores bióticos (microbiota presente) e abióticos (humidade, pH e temperatura) (Fischer *et al.*, 2010). Entre as formulações disponíveis no mercado e descritos na literatura, o principal agente antagonista utilizado são leveduras, nomeadamente estirpes de *Aureobasidium pullulans*.

O mecanismo de ação do biocontrolo baseia-se nas relações que se estabelecem entre hospedeiro (HF), patogénico e antagonista, sendo que este compete com os patogénicos por espaço e nutrientes, condicionando / inviabilizando o desenvolvimento destes, contribuindo para a redução das doenças pós-colheita (Marques, 2012). O biocontrolo é um método ecologicamente viável e seguro, com impacto reduzido no ambiente, sem acarretar a formação de resíduos no produto mas, no entanto, refere-se a inconsistência de resultados na sua utilização (Borges *et al.* 2004; Oliveira, 2007) bem como uma eficácia reduzida na comparação com fungicidas de síntese. Nesta ótica, o biocontrolo pode ser também utilizado em combinação com outra metodologia (química ou física) que potenciem os seus efeitos de *per si*.

2.4 Hortofrutícolas minimamente processados

Hortofrutícolas minimamente processados (HMP) definem-se como produtos frescos, cortados, embalados e refrigerados apresentados ao consumidor numa forma conveniente e 100% comestível (Watada e Qi, 1999). O respetivo processamento inclui operações de preparação que objetivam a eliminação das partes não edíveis e redução a dimensões adequadas (diversos tipos de corte / apresentação), operações de conservação que envolve tratamentos de natureza muito diversa contudo aplicados em baixa intensidade por forma a comprometer ao mínimo a qualidade em fresco. Estes produtos são embalados (normalmente com utilização de filmes poliméricos semi-permeáveis) e refrigerados ao longo de toda a cadeia (fabrico, distribuição e venda).

2.4.1 Processamento mínimo

O processamento mínimo apresenta como principal objetivo o fornecimento de produtos HF com qualidade próxima do estado em fresco, que possuam, tanto quanto possível, um período de vida alargado cumprindo simultaneamente requisitos de qualidade microbiológica, nutricional e sensorial. A descrição sumária das operações gerais de fabrico é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição geral das operações envolvidas no processamento mínimo.

| Operação | Descrição sumária |
|--|--|
| Escolha e calibração das matérias-primas | Durante a fase de receção / armazenamento das matérias-primas procede-se a uma escolha preliminar para eliminação de materiais estranhos e unidades HF não conformes e respetiva calibração por forma a uniformizar a dimensão dos HF. |
| Lavagem preliminar dos produtos | Remoção da sujidade proveniente do campo (solo, areias e lamas) para diminuir a contaminação microbiológica inicial das matérias-primas. |
| Descasque | Nesta fase e quando adequado, os HF são descascados e são igualmente removidas as partes não edíveis. Idealmente, deveria ser realizado manualmente por forma a minimizar os danos físicos. |
| Corte (redução de dimensão) | A redução de dimensão é imposta pelo tipo de apresentação pretendida para o produto final e pelo tipo de estrutura vegetal. |
| Lavagem e descontaminação | Adição de agentes químicos de descontaminação para redução da carga microbiana e / ou de antioxidantes para prevenir reações de oxidação enzimática durante a armazenagem do produto. Pode ser realizada por imersão dos produtos em solução (parada ou corrente), com chuveiros, em tanques com agitação ou de tambor rotativo. |
| Enxaguamento | Visa a redução da concentração de agentes químicos desinfetantes utilizados na operação anterior para garantir quantidades residuais aceitáveis (valores legais) e a qualidade organolética dos produtos. |

| | |
|--------------------------|--|
| Remoção de água | Remoção da água superficial dos produtos para reduzir a atividade microbiológica. É realizada por centrifugação ou correntes de ar. |
| Embalamento | Conservação do conteúdo em sistemas de embalagem em atmosfera modificada (filmes poliméricos flexíveis ou embalagens impermeáveis rígidas) que previnem a degradação da qualidade e recontaminação do produto. |
| Armazenagem/Distribuição | O controlo da temperatura (2 a 4 °C) é fundamental para minimizar a degradação da qualidade dado o curto período de vida associado. |

(adaptado de Abreu, 2010)

2.4.2 Consequências do processamento mínimo na qualidade

Das operações tecnológicas incluídas no processamento mínimo, as operações de descasque e corte revelam-se de grande importância onde, a partir do momento em que ocorre a ruptura celular com libertação dos conteúdos celulares e o contacto com o oxigénio, desencadeiam-se processos fisiológicos, bioquímicos e microbiológicos conducentes à rápida perda da qualidade dos produtos, limitando o período de vida dos HMP. Na Tabela 3 e relativo a frutos, apresentam-se os principais efeitos do processamento mínimo sobre a qualidade dos produtos e as respetivas causas.

Tabela 3 - Efeitos negativos do processamento mínimo na qualidade dos frutos minimamente processados e respetivas causas.

| Efeitos negativos | Causas |
|---|--|
| Aumento da suscetibilidade à desidratação | Perda da casca e aumento da superfície de transpiração. |
| Acastanhamento das superfícies cortadas | Aumento da atividade enzimática (polifenoloxidase), devido ao contacto entre enzimas e substratos promovidos pelo corte; Aumento da velocidade de amadurecimento e senescência. |
| Amolecimento excessivo dos tecidos vegetais | Degradação enzimática das paredes celulares (pectinases); Aceleração da senescência promovida pela maior taxa de libertação de etileno. |
| Formação de aromas desagradáveis | Aumento dos processos bioquímicos que conduzem à síntese de metabolitos secundários que influenciam o aroma. Ex.: reação de oxidação de ácidos gordos insaturados, catalisada pela lipoxigenase e peroxidase, dando origem a aldeídos e cetonas. |
| Perda de nutrientes | Aumento da taxa respiratória; Hidrólise enzimática; Lixiviação durante a lavagem. |
| Aumento da atividade microbiológica | Transferência da flora microbiana da casca para o interior da polpa cujo ambiente é propício ao respetivo desenvolvimento. |

(adaptado de Gorny *et al.*, 2000)

2.4.3 Conservação de produtos hortofrutícolas minimamente processados

A conservação de HMP, com manutenção da qualidade e garantia da segurança microbiológica, à semelhança das matérias-primas (HF frescos inteiros) baseia-se na aplicação de barreiras múltiplas (fatores de conservação) para controlar os fenómenos responsáveis pela deterioração de origem fisiológica / bioquímica e o desenvolvimento microbiano. Algumas das barreiras utilizadas são a temperatura em condições de refrigeração ao longo de toda a cadeia, o uso de agentes químicos (e.g. agentes antimicrobianos, antioxidantes) e a alteração da composição da atmosfera normal no interior da embalagem. A aplicação integrada destas barreiras permite baixar a intensidade de cada uma, pela possibilidade do estabelecimento de efeitos aditivos e/ou sinérgicos, minimizando o impacto sobre a frescura dos produtos.

A aplicação de tratamentos químicos na produção de HMP pode cumprir diferentes objetivos, nomeadamente a prevenção das reações de escurecimento, as alterações de textura, e as questões relacionadas com a descontaminação. Por norma, estes tratamentos são efetuados por imersão dos produtos cortados em soluções (com um ou mais químicos), por tempos variáveis entre 1 e 5 minutos, seguindo-se um enxaguamento com o propósito de minimizar a presença de resíduos químicos garantido assim os limites máximos de resíduos (LMR) na superfície do produto. As concentrações dos agentes químicos aplicados são dependentes quer dos hortofrutícolas quer da própria substância química e também da legislação em vigor em cada país.

Os tratamentos químicos mais usuais visam a redução da carga microbiana inicial dos HMP. A eficiência de descontaminação dos agentes químicos utilizados é variável, sendo dependente da microbiota presente e das características físico-químicas e morfológicas dos produtos. Neste âmbito, a descontaminação é efetuada pela imersão do produto cortado em soluções de hipoclorito de sódio refrigeradas (água clorada, HIPO) (Simons e Sanguansri, 1997). Normalmente a concentração de cloro ativo utilizada situa-se na gama de 50 a 200 ppm, por períodos de 1 a 2 minutos, sendo o mesmo dependente do tipo produto (Beuchat, 1998; Sapers, 2001). Atualmente questiona-se a capacidade real das soluções de HIPO na descontaminação de HMP com níveis de redução inferiores ao desejável (contagens após descontaminação na ordem de 10^3 UFC.g⁻¹ no que respeita à flora mesófila de acordo com Guerzoni *et al.*, (1996). De acordo com Kim *et al.*, (1999) e Nguyen-The e Carlin (1994) a baixa eficiência associada pode ser justificada pelo contacto deficitário entre o agente (HIPO) e os microrganismos. A própria morfologia heterogénea dos vegetais origina locais de difícil acesso aos agentes de descontaminação (Seymour *et al.*, 2002).

Acresce às limitações do HIPO ao nível da qualidade microbiológica dos HMP, o facto de poder alterar o aroma (conferindo aroma a desinfetante), perda de nutrientes (por oxidação), e perda de cor (lixiviação de pigmentos), conduzindo à rejeição dos produtos pelo consumidor (Alegria *et al.*, 2009). Estas limitações associadas à utilização de hipoclorito de sódio, impulsionaram a investigação para a procura de alternativas de descontaminação no âmbito do processamento mínimo, entre as quais figura a aplicação de tratamentos térmicos moderados.

A aplicação de pré-tratamentos térmicos moderados (TTM), isto é aplicação de calor às matérias-primas previamente ao processamento mínimo, é referenciada como uma potencial alternativa para o processamento mínimo de pera Rocha (Abreu *et al.*, 2011) não só pelos efeitos demonstrados ao nível da descontaminação como também por prevenir o escurecimento superficial do fruto cortado durante a armazenagem, sem prejuízo para os outros parâmetros da qualidade. Estes últimos efeitos estão associados ao facto de se impor um stress às matérias-primas induzindo assim os respetivos mecanismos de defesa em detrimento da atividade fisiológica normal do produto.

3 Desenvolvimento experimental

3.1 Materiais e procedimentos tecnológicos

3.1.1 Matéria-prima

A pera da variedade *Rocha* utilizada neste trabalho foi fornecida pela empresa CAMPOTEC no âmbito do Projeto Bio4Fruit [Integração de processos físicos e biológicos na qualidade de pomóideas [(n.º 30181; Aviso de Concurso nº 08/SI/2012) / QREN / 2013-2015]. Na generalidade os frutos apresentaram um calibre intermédio: 65 mm de diâmetro e 75 mm altura.

Na receção dos frutos ao laboratório do INIAV, os mesmos foram mantidos em condições de refrigeração (ca 0 °C; FITOCLIMA modelo S 600 Pharma) até serem utilizados nos ensaios.

3.1.2 Critérios de seleção da matéria-prima

Na constituição de lotes homogêneos efetuou-se uma seleção visual com eliminação de unidades não conformes (e.g. frutos mal conformados, com lesões físicas e/ou podridões visuais).

3.1.3 Execução de tratamentos térmicos moderados

Os frutos foram imersos em banho de água (Branson 3510E-DTH) após alcançar as condições previstas de temperatura (termopar Fluke 52). O cumprimento do tempo de tratamento foi contabilizado a partir do momento em que os frutos foram imersos em banho termostatizado. Após tratamento os frutos foram arrefecidos pela respetiva imersão em água refrigerada (± 5 °C) e secos com papel absorvente.

3.1.4 Execução de tratamentos de sonicação

Os frutos foram imersos em banho ultrassónico termostatizado (Branson 3510E-DTH) à temperatura ambiente (ca 20 °C). O cumprimento do tempo de tratamento foi contabilizado a partir do momento em que os frutos foram imersos no banho de ultrassons (42 kHz). Após tratamento os frutos foram secos com papel absorvente.

3.1.5 Execução de tratamento de termossonicação

Os frutos foram imersos em banho ultrassónico termostatizado (Branson 3510E-DTH) após alcançar as condições previstas de temperatura (termopar Fluke 52). O cumprimento do tempo de tratamento foi contabilizado a partir do momento em que os frutos foram imersos

no banho (40 °C, 42 kHz, 40 min). Após tratamento os frutos são arrefecidos pela imersão em água refrigerada (± 5 °C) e secos com papel absorvente.

3.1.6 Execução de tratamento de biocontrole

O antagonista foi obtido através da hidratação de *Blossom Protect*TM, um agente biotecnológico alternativo ao uso de fitofarmacêuticos. Este produto tem como principal agente ativo *Aureobasidium pullulans* (levedura). A solução de *Blossom Protect*TM foi preparada de acordo com as informações presentes na rotulagem, respeitando as concentrações de aplicação e mantendo-se a solução em agitação magnética até ao momento de utilização.

De seguida os frutos foram imersos numa tina com a solução preparada (numa concentração de $\sim 10^6$ UFC.mL⁻¹) até alcançar a condição prevista de tempo (1 min). O cumprimento do tempo de tratamento foi contabilizado a partir do momento em que os frutos foram imersos na tina. Após tratamento os frutos foram deixados a secar à temperatura ambiente.

3.1.7 Execução das operações de processamento mínimo

Por forma a garantir a qualidade higiénica exigida ao nível deste tipo de processamento, todos os materiais em contacto com os frutos (bancadas de trabalho, facas e tanques de descontaminação (aço inoxidável) foram previamente lavados e desinfetados (álcool a 70°). As operações unitárias de processamento mínimo foram executadas conforme se descreve na Figura 4.

Na sequência de operações adotou-se o sistema de “marcha em frente” para evitar contaminações cruzadas. Após o descasque dos frutos (manual / facas, seguiu-se o corte em quartos, com eliminação da secção interna que inclui os caroços (Figura 3).

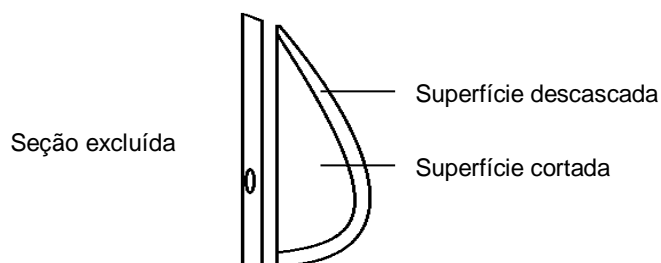


Figura 3 - Quartos de pera Rocha.

A operação de descontaminação foi efetuada, por imersão dos quartos de fruto (cestos com 20 a 25 unidades) em solução de hipoclorito de sódio (100 ppm cloro livre, pH 6,5, $T < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min) e, de enxaguamento (água, $T < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min). As soluções de descontaminação e a água de enxaguamento foram substituídas ao final de duas utilizações. No seguimento, efetuou-se o escorrimento e a secagem (papel absorvente) dos quartos. Por fim os quartos foram incluídos aleatoriamente em sacos de filmes semipermeáveis de polipropileno biorientado (permeabilidade $1100\text{ e }3000\text{ cm}^3\cdot\text{m}^{-2}\cdot 24\text{h}^{-1}$, O_2 e CO_2 a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, respetivamente) para a constituição das amostras. Os sacos foram termo-soldados e armazenados de imediato em câmara de refrigeração (FITOCLIMA modelo S 600 Pharma) à temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ até momento de análise.

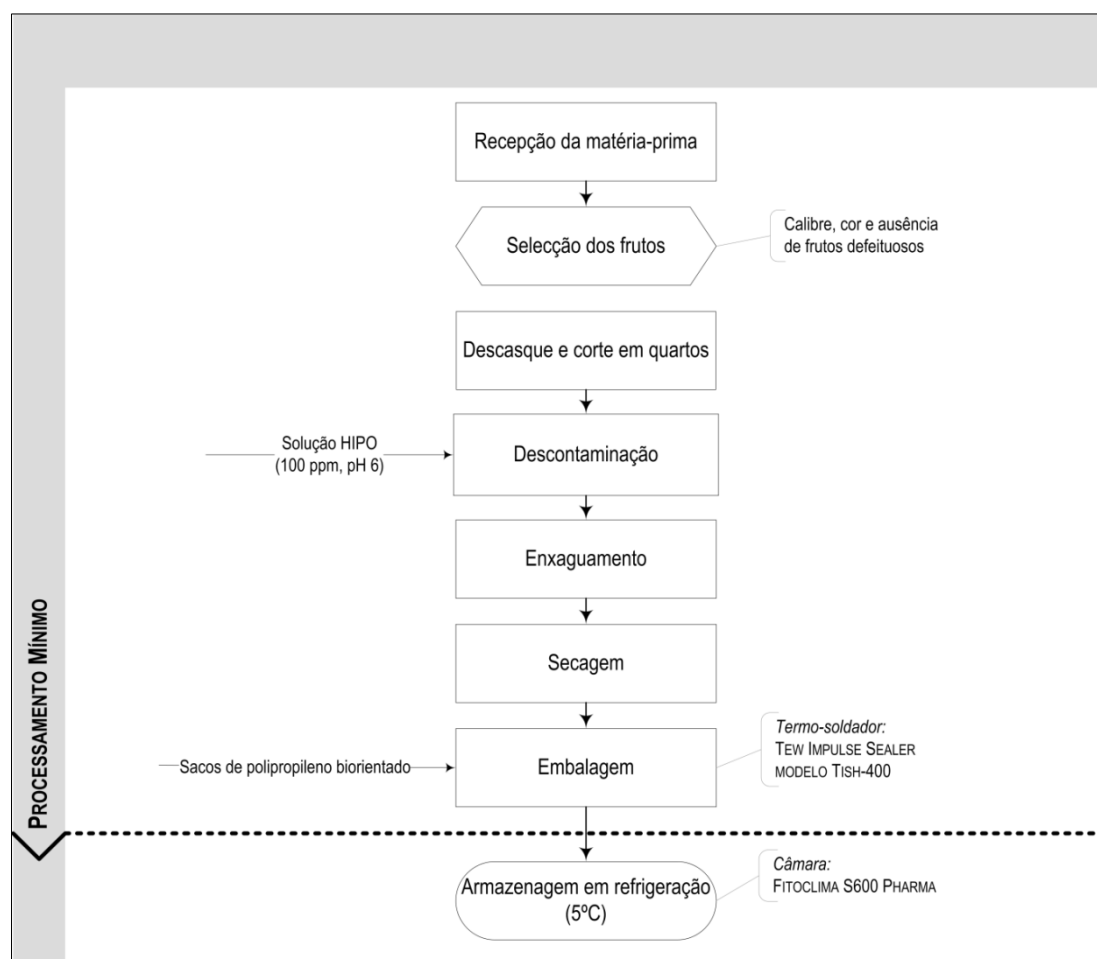


Figura 4 - Esquema geral de preparação das amostras minimamente processadas.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Cor CIELab

Os parâmetros da cor foram determinados com o auxílio do colorímetro (Minolta CR 300), no sistema CIELab (iluminante C), sendo a sua calibração efetuada a partir do padrão de referência ($L^* = 97,10$; $a^* = 0,08$; $b^* = 1,80$). Os resultados expressam a média de 10 determinações por amostra para a cor externa do fruto (carepa) e de 5 determinações para cor do interior (polpa) do mesmo após corte transversal.

Por leitura direta no aparelho obtiveram-se os parâmetros L^* , a^* e b^* , onde L^* representa a luminosidade da amostra (intervalo de variação entre 0 – preto e 100 – branco), o parâmetro a^* traduz as variações de cor entre vermelho (+60) e verde (-60) e o parâmetro b^* as variações entre amarelo (+60) a azul (-60). A aproximação destas coordenadas ao valor nulo traduz cores neutras como o branco, o cinzento e o preto.

Para além dos parâmetros $L^*a^*b^*$, foram ainda calculadas a saturação ou cromaticidade da cor C^* (*Chroma*), a tonalidade $^{\circ}h$ (*Hue*), a diferença total de cor (TCD, *Total Colour Difference*) e o índice de escurecimento (WI, *Whiteness Index*), sendo que este último apenas foi determinado para as tomas de cor do interior do fruto (polpa).

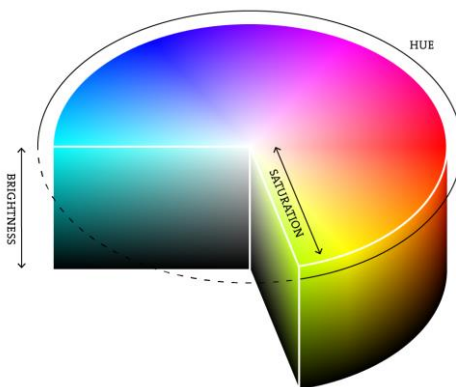


Figura 5 - Representação dos três índices de avaliação da cor (L^* , *chroma* e *hue*).
(adaptado de: <http://www.processing.org/tutorials/color/>)

A cromaticidade C^* (Eq. 1) é uma medida do croma ou da saturação da cor e representa a distância ao eixo neutro. O atributo de cor Hue ($^{\circ}h$, Eq. 2 a 4) pode ser definido como o ângulo (0-360°) que transmite a tonalidade de cor (nome da cor) (Figura 5). Os ângulos formados variam pelos eixos dos parâmetros a^* e b^* , definindo assim a tonalidade da cor, sendo que ângulos entre 0° e 90° correspondem aos vermelhos, laranjas e amarelos; de 90° a 180° os amarelos, amarelo-verdes e verdes; de 180° a 270° os verdes, cianos e azuis; de

270° a 360° os azuis, púrpuras, magentas e novamente os vermelhos (Dafne, s.d.). Os atributos C^* e h^o são calculados através das seguintes expressões matemáticas:

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$h^o = \frac{(\arctg \frac{b^*}{a^*})}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$h^o = 180 + \frac{(\arctg \frac{b^*}{a^*})}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* < 0 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$h^o = 360 + \frac{(\arctg \frac{b^*}{a^*})}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad (\text{Eq. 4})$$

A diferença total de cor (TCD) (Eq. 5) é o parâmetro que traduz as variações da cor entre uma dada amostra (L^*, a^*, b^*) e uma amostra referência (L^*_0, a^*_0, b^*_0). Neste estudo as amostras referência foram peras sem qualquer tipo de tratamento. O TCD é obtido pela seguinte expressão:

$$TCD = \sqrt{(L^* - L^*_0)^2 + (a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

O índice de escurecimento (WI) (Eq. 6) é o parâmetro que permite avaliar o escurecimento, traduzindo a maior ou menor presença de material branco na superfície dos hortofrutícolas melhor correlacionando a alteração da cor do interior da pera (polpa) (Boline e Huxsoll, 1991). Sendo determinado pela seguinte expressão.

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 6})$$

3.2.2 pH e Teor em sólidos solúveis (TSS)

O valor de pH foi medido (potenciômetro Crison Micro pH 2001) no homogeneizado (Robot Termomix) de pera : água (1:1, p:p). Os valores médios resultaram da média de 3 determinações por amostra. O teor em sólidos solúveis foi determinado no sumo filtrado (refratômetro de bancada digital Atago, DR-A1). Os resultados são expressos em °Brix (percentagem de sólidos solúveis por 100 g de produto), resultantes da média de 3 determinações por amostra.

3.2.3 Perda de massa

A perda de massa foi determinada a partir da pesagem de 5 frutos de cada lote em cada ponto de análise com o auxílio de uma balança semi-analítica (Mettler, Pj 3000) com precisão de 0,1 g. Após pesagem os frutos foram restituídos às condições iniciais. A perda de massa foi determinada (Eq. 7) relativamente ao peso inicial (P_i) da amostra no dia 0 (início da armazenagem).

$$(\%)Perda\ de\ massa = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad \begin{array}{l} P_i - \text{peso inicial da amostra no dia 0;} \\ P_f - \text{peso final da amostra no dia x.} \end{array} \quad (\text{Eq. 7})$$

3.2.4 Incidência de podridão visível

A incidência da podridão visível foi calculada através da equação 8.

$$\% \text{ incidência da podridão visível} = \frac{X}{\text{dimensão da amostra}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

Sendo X o número de frutos com podridão visível.

3.2.5 Firmeza

A análise da textura para determinação da firmeza nas peras foi realizada efetuando um teste de penetração num texturómetro (Stable Micro Systems, TA-HDi®). O teste de penetração foi realizado a uma velocidade de 1 mm.s⁻¹ com uma distância de penetração de 10 mm após contacto com a superfície do fruto, com recurso a uma sonda de inox de 2 mm de diâmetro. Os resultados de firmeza foram obtidos através do pico de força máxima (N) das curvas de força-distância. A determinação foi efetuada à temperatura ambiente, sendo os frutos primeiramente estabilizados a essa condição de temperatura. Os resultados foram expressos como a média de 3 determinações por amostra para os diferentes tipos de ensaio.

3.2.6 Conteúdo fenólico total (CFT)

A técnica utilizada para a determinação do conteúdo fenólico total é baseada na reação colorimétrica provida pelo reagente de Folin-Ciocalteu de acordo com o método descrito por Swain & Hillis (1959). O extrato foi obtido através da homogeneização de 5 g de pera em 20 mL de metanol (100%), utilizando um polytron (Yellow line DI 25 basic) a extração compreende um período de espera *overnight* (± 24 h) a 5 °C. Após a obtenção do extrato

límpido (sobrenadante) por centrifugação a 29000 g durante 15 min a 4 °C (Sorvall Instruments RC5C, rotor n. SS-34), procedeu-se ao doseamento. Nesta etapa foram adicionados em cuvets de 4,5 mL, 2400 µL água nanopura, 150 µL do sobrenadante (extrato fenólico), seguido pela adição de 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu a 0,25 N. Agitam-se as misturas e após 3 min de reação, são adicionados 300 µL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 1 N, agitam-se novamente e reservam-se num ambiente de baixa luminosidade à temperatura ambiente durante 2 h. As leituras espectrofotométricas a 725 nm foram obtidas utilizando um espectrofotómetro (ATI Unicam UV/VIS 4). O conteúdo fenólico total foi expresso em mg de equivalentes de ácido clorogénico por 100 g ($\text{mg EAC} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) e calculado a partir da interpolação dos valores de absorvância da curva de calibração de ácido clorogénico com solução padrão. Os valores obtidos foram resultantes da média de 3 determinações por amostra.

3.2.7 Atributos microbiológicos

Inicialmente para a contagem de microrganismos foi necessário realizar uma colheita de amostras, a mesma seguiu o procedimento referido na norma ISO 6887-4: 2003, contudo foi utilizada a parte externa do fruto (casca) devido à maior incidência de contaminação e utilizadas 10 g de amostra de casca devido às amostragens disponíveis para os ensaios, por outro lado para o ensaio do processamento mínimo foram utilizadas 20 g de fruto, mas neste caso isente de casca. O tratamento de resultados obtidos realizou-se segundo a norma ISO 7218: 2007, todos os resultados microbiológicos são referentes a grama de casca do fruto ($\text{Log}_{10}\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ de casca) e não pelo seu todo, e em grama de polpa do fruto ($\text{Log}_{10}\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ de polpa) no ensaio dos minimamente processados. As análises das amostras foram feitas em triplicado para cada condição (ensaio).

A determinação de microrganismos aeróbios a 30 °C (Micro 30 °C) foi realizada segundo a norma ISO 4833: 2003 e para bolores e leveduras (B&L) a norma ISO 21527-1: 2008.

3.2.8 Análise sensorial

As amostras foram sujeitas a avaliação sensorial informal por um painel não treinado de 6 provadores. Foram utilizadas escalas de 1 a 5, para a avaliação dos atributos cor, firmeza e apreciação global das amostras segundo uma ficha de prova (Anexo C, Tabela C2 e Anexo D, Tabela D3). Os descritores utilizados para a definição da escala são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Escala e respectivos descritores adotados na avaliação dos atributos sensoriais de pera Rocha inteira e minimamente processada.

| Escala | Atributo Sensorial | | |
|--------|--------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| | Cor | Firmeza | Apreciação Global |
| 1 | Verde / Claro* | Muito firme | Muito bom |
| 2 | Moderadamente verde / claro* | Firme | Bom |
| 3 | Ligeiramente amarelo / escuro* | Moderadamente firme | Suficiente (limite da aceitabilidade) |
| 4 | Amarelo / Escuro* | Mole | Mau |
| 5 | Amarelo escuro / Muito escuro* | Muito mole | Muito mau |

*Avaliação dos atributos relativamente a pera minimamente processada

3.3 Métodos estatísticos

O tratamento estatístico de resultados foi efetuado com recurso ao software, StatisticaTM v8.0 (Statsoft, Inc., 2007).

3.3.1 Análise de variância (ANOVA)

Para separação de médias utilizou o teste Tukey com um nível de significância de 5%.

3.3.2 Metodologia de superfícies de resposta (RSM)

O delineamento experimental para a situação da metodologia de superfícies de resposta (RSM), envolveu quatro etapas: seleção das variáveis independentes e respetivos níveis; formulação do delineamento central composto rotacional - DCCR; construção do modelo; e encontrar as soluções ótimas na situação em que o modelo apresentou validade estatística (Arteaga *et al.*, 1994).

O delineamento experimental incluiu duas variáveis independentes ($n=2$) temperatura e tempo. O ensaio compreendeu: 2 n pontos para um modelo fatorial completo (n_q =pontos quadráticos) (níveis +1 e -1), 2 n pontos axiais (n_e =pontos estrela), codificados com $+\alpha$ e $-\alpha$. O valor de α deriva do número de pontos do modelo fatorial (F) e do número de variáveis (n), sendo calculado pela equação $\alpha = \sqrt{n_q}$, onde n_q = n° de pontos quadráticos, resultando

$+\alpha = 1,41$ e $-\alpha = -1,41$, para as 2 variáveis. Tendo ainda 6 repetições no ponto central (n_0 =pontos centrais). O ponto central fornece uma média para estimar o erro experimental e a falta de ajuste e, os pontos axiais são adicionados para estimar a curvatura do modelo.

Para cada resposta em estudo (variável dependente Y), os respectivos resultados experimentais foram ajustados a equações polinomiais de segunda ordem (Eq. 8) e submetidos à análise de regressão multivariada (ANOVA) para avaliar a qualidade dos modelos.

$$Y = b_0 + b_1T + b_{11}T^2 + b_2t + b_{22}t^2 + b_{12}Tt \quad \text{(Eq. 8)}$$

b_n : coeficientes de regressão

T, t : variáveis independentes,
temperatura e tempo,
respetivamente

Na avaliação da significância e validade dos modelos foram tidos em conta os seguintes parâmetros: coeficientes de regressão múltipla (r^2 e r^2_{ajuste}), falta de ajuste do modelo (*lack of fit*) e erro puro. Considerou-se um nível de ajuste adequado para os modelos quando a respetiva falta de ajuste é não significativa ($p > 0,05$), o erro puro é significativo ($p < 0,05$), tanto quanto possível a proximidade à unidade para r^2 e uma diferença menor que 0,1 unidade entre r^2 e r^2_{ajuste} (Montgomery, 1991). Quando se revelou necessário e para fazer cumprir os critérios mencionados foi efetuada a remoção de efeitos entre as variáveis independentes em estudo (linear e/ou quadrático e/ou combinado) através da metodologia “passo-a-passo” (passo-a-trás / backward removal), utilizando o GRM (Modelo Geral de Regressão).

3.4 Resultados experimentais

Na avaliação dos tratamentos considerados: térmico moderado, sonicação e biocontrolo, nos âmbitos da armazenagem pós-colheita e do processamento mínimo de pera Rocha foram conduzidos os seguintes estudos:

- Estudo de otimização da aplicação singular do tratamento térmico moderado;
- Estudo de avaliação dos efeitos da integração de tratamentos: térmico e sonicação;
- Estudo da avaliação dos efeitos da integração de tratamentos durante a armazenagem: térmico e biocontrolo;
- Estudo do tratamento térmico moderado na aptidão da matéria-prima para processamento mínimo.

3.4.1 Estudo de otimização da aplicação singular do tratamento térmico moderado

Objetivo e delineamento experimental

Este ensaio teve por objetivo otimizar a gama de intensidade térmica (binómio Temperatura / Tempo) suficiente para alcançar a máxima redução da microbiota do fruto sem comprometer os atributos da qualidade em fresco de pera Rocha.

Para constituição de um lote homogéneo (ca 7,5 kg) procedeu-se à seleção visual de um lote de frutos segundo os critérios descritos no procedimento 3.1.2 Após esta seleção os frutos foram utilizados para a constituição das amostras segundo as condições definidas no delineamento Central Composto Rotacional (14 amostras) e para a caracterização inicial da matéria-prima (amostra controlo).

Tabela 5 - Matriz codificada e decodificada na otimização do tratamento térmico; (C - ponto central).

| Corridas | Codificada | | Decodificada | |
|----------|------------|-----------|------------------|-------------|
| | A | B | Temperatura (°C) | Tempo (min) |
| 11 (C) | 0 | 0 | 48 | 28 |
| 3 | 1 | -1 | 60 | 15 |
| 2 | -1 | 1 | 35 | 40 |
| 12 (C) | 0 | 0 | 48 | 28 |
| 10 (C) | 0 | 0 | 48 | 28 |
| 13 (C) | 0 | 0 | 48 | 28 |
| 7 | 0 | $-\alpha$ | 48 | 10 |
| 4 | 1 | 1 | 60 | 40 |
| 8 | 0 | α | 48 | 45 |
| 1 | -1 | -1 | 35 | 15 |
| 5 | $-\alpha$ | 0 | 30 | 28 |
| 6 | α | 0 | 65 | 28 |
| 14 (C) | 0 | 0 | 48 | 28 |
| 9 (C) | 0 | 0 | 48 | 28 |

O delineamento RSM a duas variáveis independentes (T, t) compreendeu o teste das seguintes gamas de variação: Temperatura: 30 °C a 65 °C e tempo: 10 a 45 min (Tabela 5). Estes valores de intensidade térmica foram selecionados com base em estudos prévios (Abreu *et al.*, 2003; Abreu *et al.*, 2005; Abreu, 2010; Abreu, 2011).

O delineamento RSM considerado incluiu 14 ensaios independentes, com 4 pontos relativos ao planeamento fatorial completo (n_q), 4 pontos estrela (α) (n_e) e 6 repetições do ponto central (n_0), conforme se apresenta na Tabela 5 (níveis codificados e decodificados).

A execução dos tratamentos térmicos e posterior preparação das amostras cumpriu o procedimento 3.1.3, após o que se seguiu a embalagem das 14 amostras (4 peras por cada condição definida no RSM) em sacos de polietileno termoselados e respetiva armazenagem em câmara de refrigeração (ca 5 °C, Cryocell), até serem analisadas no dia seguinte (Figura 6).

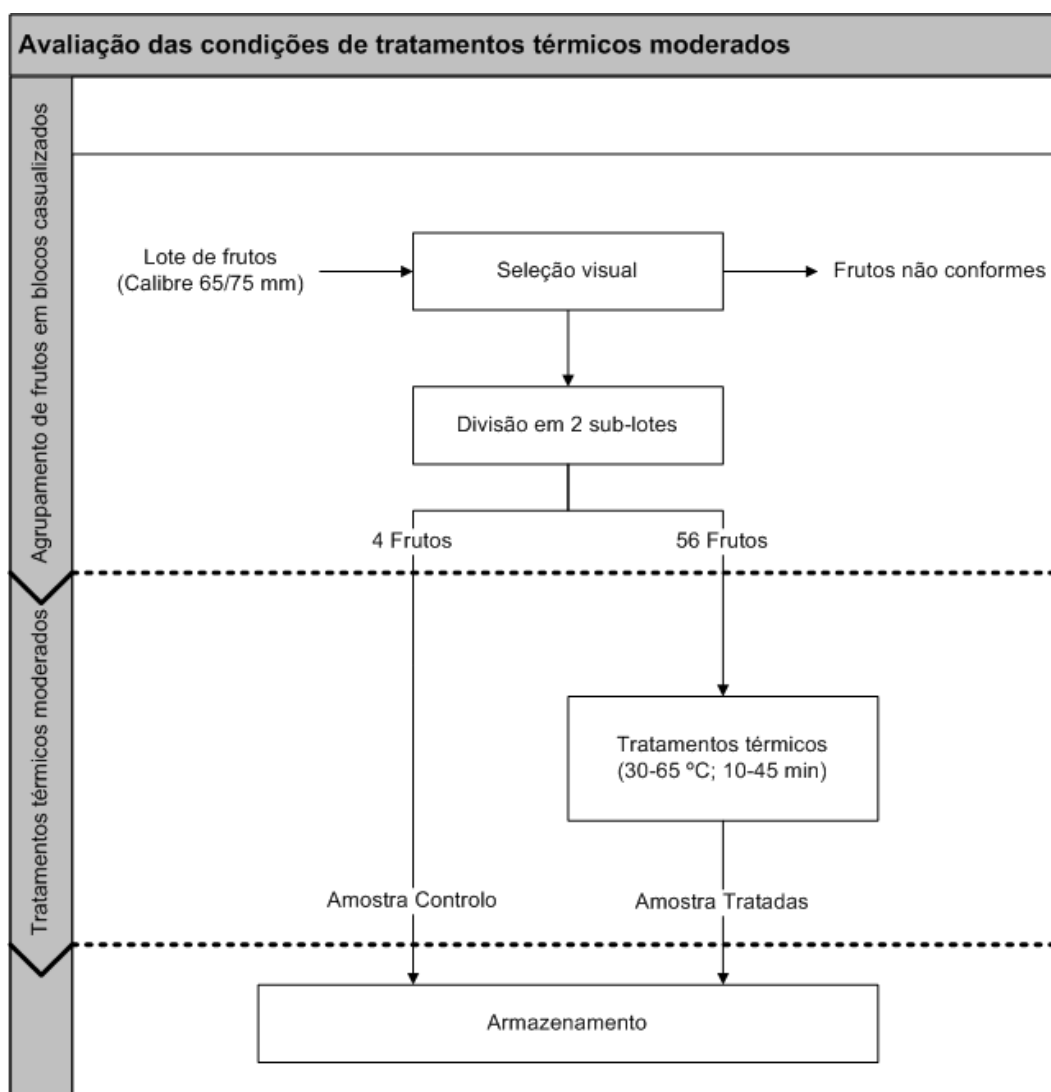


Figura 6 - Diagrama do delineamento experimental da aplicação de tratamentos térmicos moderados face a amostras de peras não tratadas (C).

Para a contabilização dos efeitos do tratamento térmico foram ainda preparadas amostras controlo correspondentes a frutos sem aplicação de tratamento térmico (dimensão: 4 frutos) submetidos às mesmas condições de armazenagem das amostras tratadas. Os resultados das amostras controlo correspondem aos valores de referência quer do nível de contaminação microbiológica inicial dos frutos como para o cálculo das variações totais de cor (TCD).

Todas as amostras (tratadas termicamente e controlo) foram avaliadas face ao seguinte protocolo: cor CIELab, firmeza (pico de força máximo), teor de sólidos solúveis (TSS), pH, contagens de microrganismos a 30 °C (Micro 30 °C), bolores e leveduras (B&L). Foi ainda efetuado o registo fotográfico das mesmas (Anexo A, Tabela A1).

Tabela 6 - Valores médios (\pm DP) dos atributos físicos e microbiológicos referentes à matéria-prima (sem tratamentos) no tempo 0.

| Atributos | MP Tempo 0 |
|---|----------------|
| Físico-químicos | |
| Cor | |
| L ₀ *(Carepa) | 73,2 \pm 3,4 |
| L ₀ *(Polpa) | 75,7 \pm 3,0 |
| °h (Carepa) | 93,1 \pm 3,8 |
| WI (Polpa) | 71,6 \pm 3,2 |
| Firmeza (N) | 9,0 \pm 0,1 |
| pH | 4,9 |
| TSS (°Brix) | 13 |
| Microbiológicos (Log ₁₀ UFC.g ⁻¹) | |
| Micro 30 °C | 3,9 \pm 0,4 |
| B&L | 4,0 \pm 0,5 |

Resultados e discussão

Os resultados da avaliação dos atributos, L*, °h, TCD, firmeza, Micro a 30 °C e B&L, em função das variáveis independentes em estudo (T, t), foram ajustados ao modelo polinomial quadrático de 2ª ordem, cuja análise ANOVA associada é apresentada na Tabela A2 constante no Anexo A.

Luminosidade (L^*)

O modelo que expressa as variações da luminosidade (L^*) representado graficamente na Figura 7, é considerado adequado na previsão das respostas face aos critérios de ajuste utilizados 3.3.2. Neste sentido o modelo apresenta uma falta de ajuste não significativa (Tabela A2) expressando que a variância contida nos resíduos é explicada pelos erros experimentais (com um grau de confiança de 95%) bem como associa coeficientes de regressão (r^2 e $r^2_{ajustado}$) perto da unidade (0,98 e 0,97) ($p < 0,01$).

Conclui-se assim, que o modelo (Eq. 9) que descreve o comportamento de L^* , em função de T e t , sem eliminação de qualquer dos efeitos (quadrático, linear e interações), revela um carácter preditivo e uma boa reprodutibilidade dos erros experimentais, para a gama de variação estudada.

Tabela 7 - Coeficientes de regressão e respetivas probabilidades do modelo quadrático para o parâmetro L^* .

| Fator | L^* ($r^2 = 0,98$; $r^2_{ajust} = 0,97$) | |
|------------|---|----------|
| | Coeficiente | p |
| Interseção | 33,42632 | 0,055011 |
| T | 1,90430 | 0,009159 |
| T^2 | -0,02394 | 0,003176 |
| t | 0,91539 | 0,062368 |
| t^2 | -0,00744 | 0,159916 |
| tT | -0,01954 | 0,022917 |

De acordo com os coeficientes de regressão (Tabela 7) verifica-se que as variações de temperatura (efeitos linear e quadrático) e da interação (t, T) foram significativas ($p < 0,05$), para as respostas geradas pelo modelo. Do exposto, constata-se que as variações significativas de L^* , descritas através do respetivo modelo (Eq. 9) resultaram maioritariamente das variações de temperatura do pré-tratamento aplicado ao fruto inteiro.

As representações gráficas para as respostas de L^* geradas pelo modelo quadrático em função das variáveis independentes encontram-se na Figura 7.

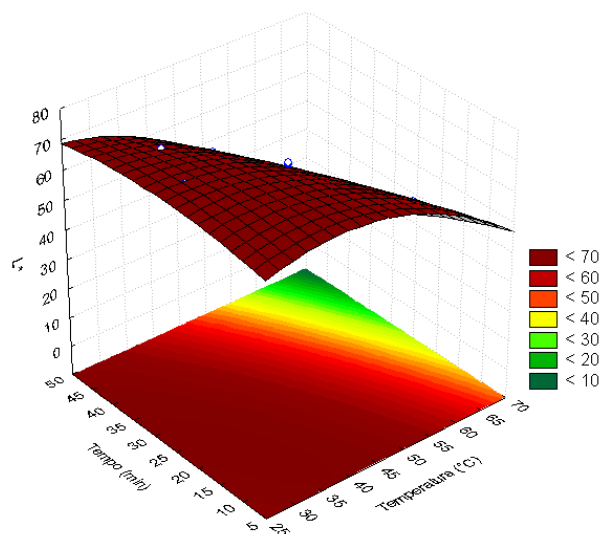


Figura 7 - Superfície de resposta para o parâmetro L^* (projeção no ponto central).

$$L^* = 33,2 + 1,9T - 0,02T^2 + 0,9t + 0,007t^2 - 0,02tT \quad (\text{Eq. 9})$$

Da Figura 7 verifica-se a diminuição dos valores de L^* dos frutos gradual ao aumento da temperatura e do tempo de tratamento. No entanto, os coeficientes associados às variáveis (linear e quadrático) temperatura são maiores do que para a variável tempo traduzindo que a tendência de escurecimento é mais influenciada pelas variações de temperatura.

Valores de temperatura de 40 °C e tempo de tratamento 40 min, devolvem valores de L^* de ± 65 , condição que traduz poucas diferenças de luminosidade a nível visual face a frutos não tratados ± 73 (Tabela 6).

Tonalidade (°h)

À semelhança do comportamento anterior o modelo que expressa a variação da tonalidade mostrou-se adequado quer pelos respetivos critérios de ajuste (Tabela A2) quer porque os coeficientes de regressão do modelo (r^2) situam-se perto da unidade (0,97) e próximos do r^2 ajustado (0,96) ($< 0,01$). Assim, o modelo que descreve o comportamento de °h, em função de T e t, sem eliminação de qualquer dos efeitos (quadrático, linear e interações), revela um carácter preditivo e uma boa reprodutibilidade dos erros experimentais, dentro da gama de variação estudada.

Tabela 8 - Coeficiente de regressão e respectivas probabilidades do modelo quadrático para o parâmetro °h.

| Fator | °h ($r^2 = 0,97$; $r^2_{ajust} = 0,96$) | |
|----------------|--|----------|
| | Coeficiente | p |
| Interseção | 72,54680 | 0,004164 |
| T | 1,65545 | 0,021452 |
| T ² | -0,02359 | 0,004814 |
| t | -0,16642 | 0,705445 |
| t ² | 0,00822 | 0,154235 |
| tT | -0,01540 | 0,065242 |

De acordo com os coeficientes de regressão (Tabela 8) verifica-se que as variações de temperatura (efeitos linear e quadrático), foram significativas ($p < 0,05$), para as respostas geradas pelo modelo, (Eq. 10), constatando-se que as alterações significativas da tonalidade da cor resultaram maioritariamente das variações de temperatura do pré-tratamento aplicado ao fruto inteiro.

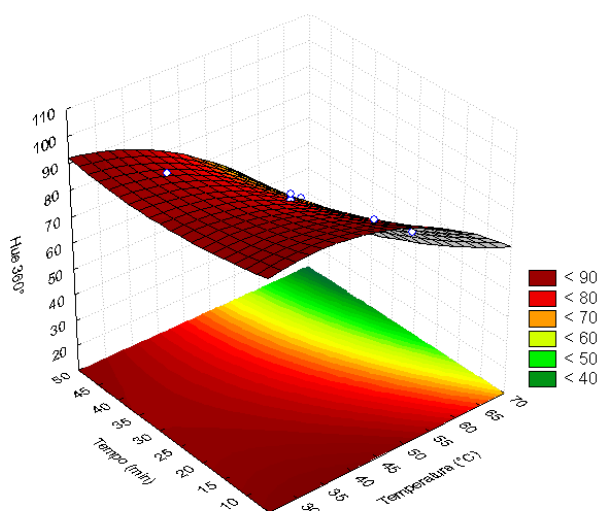


Figura 8 - Superfície de resposta para o parâmetro °h (projeção no ponto central).

$$^{\circ}h = 72,5 + 1,7T - 0,02T^2 - 0,2t + 0,008t^2 - 0,02tT \quad (\text{Eq. 10})$$

As representações gráficas para as respostas de °h geradas pelo modelo quadrático em função das variáveis independentes encontram-se na Figura 8. A diminuição da tonalidade com o aumento da intensidade do tratamento traduz o acastanhamento dos frutos.

No entanto, na gama de valores de temperatura menores ou iguais a 40 °C e tempos de tratamento inferiores a 40 minutos são previstos pelo modelo valores angulares de cerca de 83 inferiores aos apresentados pelos frutos não tratados (amostras controlo) de cerca de 93 (Tabela 6).

Diferença total de cor (TCD)

Na análise da diferença total de cor (TCD), verifica-se que a falta de ajuste do modelo foi igualmente não significativa (Tabela A2) e os coeficientes de regressão do modelo (r^2) situaram-se perto da unidade (0,98 e 0,97) e próximos do $r^2_{ajustado}$ ($<0,01$). Assim, o modelo expresso pela Eq. 11 descreve o comportamento de TCD, em função de T e t, sem eliminação de qualquer dos efeitos (quadrático, linear e interações), revelando um carácter preditivo e uma boa reprodutibilidade dos erros experimentais, dentro da gama de variação estudada.

De acordo com os coeficientes de regressão (Tabela 9) verifica-se que as variações de temperatura (efeitos linear e quadrático) e, da interação de ambas as variáveis, foram significativas ($p < 0,05$), para os valores de TCD principalmente da alteração da temperatura do pré-tratamento aplicado ao fruto inteiro.

Tabela 9 - Coeficientes de regressão e respetivas probabilidades do modelo quadrático para o parâmetro TCD.

| Fator | TCD ($r^2 = 0,98$; $r^2_{ajust} = 0,97$) | |
|----------------|---|----------|
| | Coeficiente | p |
| Interseção | 50,76 | 0,015589 |
| T | -2,60 | 0,003049 |
| T ² | 0,03 | 0,000941 |
| t | -0,72 | 0,132671 |
| t ² | 0,003 | 0,524937 |
| tT | 0,022 | 0,017118 |

As representações gráficas para as respostas de TCD geradas pelo modelo quadrático em função das variáveis independentes encontram-se na Figura 9.

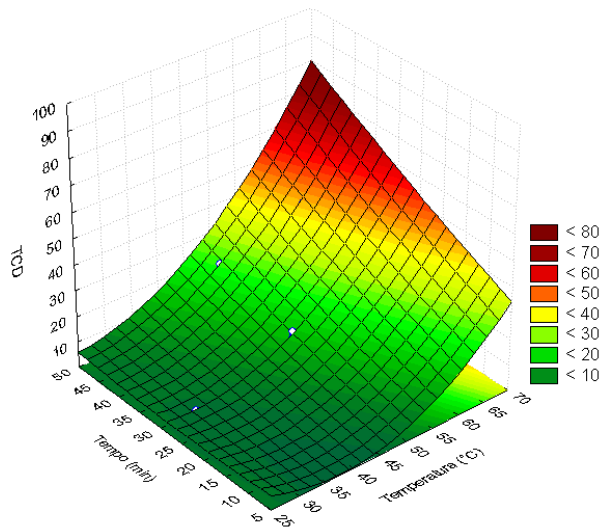


Figura 9 - Superfície de resposta para o parâmetro TCD (projeção no ponto central).

$$TCD = 50,8 - 2,6T + 0,03T^2 - 0,7t + 0,003t^2 - 0,02tT \quad (\text{Eq. 11})$$

Da Figura 9 verifica-se que a alteração da cor dos frutos face aos valores da matéria-prima (TCD) é gradual ao aumento da temperatura e com menor expressão pelo aumento do tempo de tratamento. Valores de temperatura inferiores a 40 °C (e tempo de tratamento menor do que 40 min) devolvem valores de TCD inferiores a 11, condição que traduz as menores diferenças de cor face aos frutos não tratados.

Firmeza

O modelo obtido para a firmeza (pico de força máximo, N) (Eq. 12) não apresentou ajuste adequado mesmo após a eliminação de efeitos (backward removal). Assim, os resultados da análise de regressão apresentados na Tabela A2 e os coeficientes de regressão do modelo (r^2 e r^2_{ajustado}) (0,34 e 0,22 respetivamente) mostram que a falta de ajuste é significativa e que os coeficientes de regressão (Tabela 10) são baixos apesar da diferença entre o r^2 e o r^2_{ajustado} ser inferior a 0,1 unidade.

Conclui-se assim, que o modelo (Eq. 12) que descreve o comportamento da firmeza não revela um carácter preditivo nem reprodutibilidade dos erros experimentais, para a gama de variação estudada.

Tabela 10 - Coeficientes de regressão e respectivas probabilidades do modelo quadrático para o atributo firmeza.

| Fator | Firmeza ($r^2 = 0,34$; $r^2_{\text{ajust}} = 0,22$) | |
|----------------|--|----------|
| | Coeficiente | p |
| Interseção | 10,81689 | 0,000491 |
| t | -0,24430 | 0,060841 |
| t ² | 0,00430 | 0,063539 |

Neste modelo (Eq. 12) as variações de firmeza resultam apenas da duração do tempo de tratamento independentemente da temperatura a que se sujeitam os frutos.

As representações gráficas para as respostas de firmeza geradas pelo modelo quadrático em função das variáveis independentes encontram-se na Figura 10.

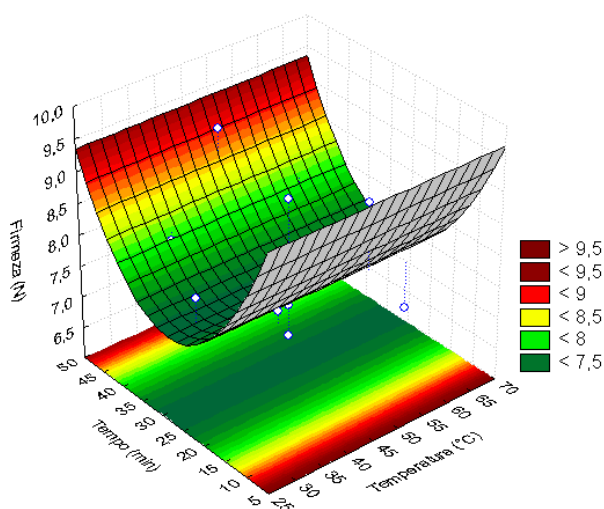


Figura 10 - Superfície de resposta para o parâmetro firmeza (projeção no ponto central).

$$Firmeza = 10,8 - 0,2t + 0,004t^2 \quad (\text{Eq. 12})$$

No entanto perante a ausência de diferenças significativas entre os valores médios de firmeza obtidos para as amostra tratadas termicamente, apresentados na Tabela 11, conclui-se que a firmeza dos frutos não é alterada para a gama de intensidade térmica testada.

Tabela 11 - Valores médios de firmeza (\pm DP) para as condições de tratamentos testadas.

| Id. Amostra | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Firmeza (N) |
|-------------|------------------|-------------|-----------------------------|
| A | 48 | 28 | 7,7 ^{ab} \pm 1,8 |
| B | 60 | 15 | 7,1 ^{ab} \pm 0,7 |
| C | 35 | 40 | 8,0 ^{ab} \pm 1,1 |
| D | 48 | 28 | 7,1 ^{ab} \pm 0,7 |
| E | 48 | 28 | 8,7 ^{ab} \pm 0,9 |
| F | 48 | 28 | 7,0 ^{ab} \pm 1,3 |
| G | 48 | 10 | 9,4 ^b \pm 0,7 |
| H | 60 | 40 | 6,7 ^{ab} \pm 0,7 |
| I | 48 | 45 | 9,1 ^{ab} \pm 0,8 |
| J | 35 | 15 | 8,0 ^{ab} \pm 1,3 |
| K | 30 | 28 | 7,8 ^{ab} \pm 0,9 |
| L | 65 | 28 | 7,5 ^{ab} \pm 0,1 |
| M | 48 | 28 | 7,6 ^{ab} \pm 0,8 |
| N | 48 | 28 | 6,5 ^a \pm 0,5 |

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey).

pH e TSS

Os modelos obtidos para as respostas pH e TSS, mesmo após eliminação de efeitos (backward removal), apresentam ajustes inadequados (r^2 e r^2 ajustado $<0,6$; falta de ajuste significativo), sendo estes justificados pela ausência de efeito dos binómios testados, embora os valores médios de pH e TSS entre amostras tratadas (Tabela 13) apresentem diferenças significativas, contabilizando na gama testada variações de 0,4 e 4,3 unidades respetivamente, não exercendo as mesmas expressividade no ajuste do modelo.

Conclui-se assim, que o comportamento que descreve do pH, em função de T, t e interação, não revela um carácter preditivo nem reprodutibilidade dos erros experimentais, para a gama de variação estudada.

Tabela 12 - Coeficientes de regressão e respectivas probabilidades do modelo quadrático para o atributo pH.

| Fator | pH ($r^2 = 0,56$; $r^2_{ajust} = 0,43$) | |
|------------|--|----------|
| | Coeficiente | p |
| Interseção | 6,18647 | 0,000068 |
| T | -0,02857 | 0,041992 |
| t | -0,05796 | 0,021353 |
| tT | 0,00119 | 0,020995 |

Neste modelo (Eq. 13) as variações de pH resultam da temperatura e tempo de tratamento linear e interação.

As representações gráficas para as respostas de firmeza geradas pelo modelo quadrático em função das variáveis independentes encontram-se na Figura 11.

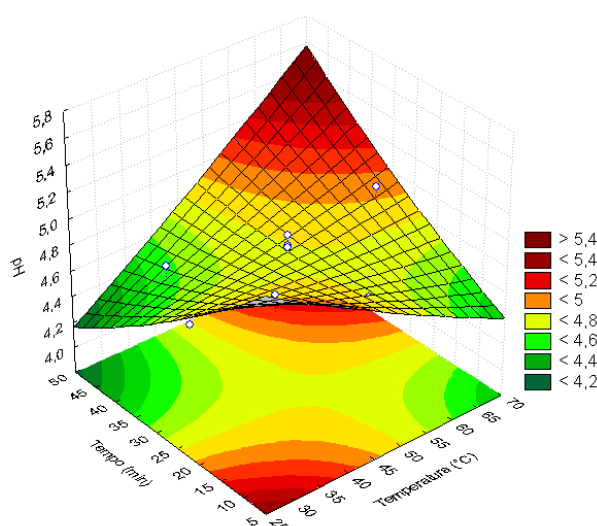


Figura 11 - Superfície de resposta para o parâmetro pH (projeção no ponto central).

$$pH = 6,2 - 0,03T - 0,06t - 0,001tT \quad (\text{Eq. 13})$$

Da Figura 11 verifica-se que a alteração de pH face aos valores médios da matéria-prima (4,9) são ligeiramente influenciados pela temperatura apresentando uma tendência de diminuição com menor expressão para o tempo de tratamento. Valores de temperatura inferiores a 40 °C e tempo de tratamento menor do que 40 min, correspondem a valores de pH de 4,6, condição que não traduz diferenças expressivas relativamente à matéria-prima não tratada.

O parâmetro TSS não foi possível ajustar ao modelo polinomial quadrático devido à falta de relação entre os teores de TSS e as condições testadas.

Tabela 13 - Valores médios de pH e TSS (\pm DP) para as condições de tratamentos testadas.

| Id. Amostra | Temperatura (°C) | Tempo (min) | pH | TSS |
|-------------|------------------|-------------|------------------------------|-----------------------------|
| A | 48 | 28 | 4,7 ^{ab} \pm 0,1 | 15,4 ^g \pm 0,1 |
| B | 60 | 15 | 4,6 ^{ab} \pm 0,1 | 14,6 ^f \pm 0,1 |
| C | 35 | 40 | 4,7 ^{ab} \pm 0,0 | 15,5 ^g \pm 0,1 |
| D | 48 | 28 | 4,7 ^{abc} \pm 0,1 | 12,9 ^b \pm 0,1 |
| E | 48 | 28 | 4,9 ^{cde} \pm 0,1 | 13,7 ^d \pm 0,1 |
| F | 48 | 28 | 4,9 ^{de} \pm 0,0 | 12,8 ^b \pm 0,1 |
| G | 48 | 10 | 4,9 ^{de} \pm 0,0 | 12,5 ^a \pm 0,0 |
| H | 60 | 40 | 5,0 ^e \pm 0,1 | 12,7 ^b \pm 0,1 |
| I | 48 | 45 | 4,8 ^{bcd} \pm 0,1 | 12,9 ^b \pm 0,2 |
| J | 35 | 15 | 5,0 ^e \pm 0,1 | 12,4 ^a \pm 0,1 |
| K | 30 | 28 | 4,6 ^a \pm 0,0 | 12,4 ^a \pm 0,0 |
| L | 65 | 28 | 5,0 ^e \pm 0,1 | 14,0 ^e \pm 0,1 |
| M | 48 | 28 | 4,9 ^{de} \pm 0,0 | 13,4 ^c \pm 0,1 |
| N | 48 | 28 | 4,7 ^{abc} \pm 0,1 | 16,7 ^h \pm 0,0 |

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey).

Contagens microbiológicas

O modelo (Eq. 13) que descreve a eliminação parcial de microrganismos a 30 °C dos frutos e cujos resultados de regressão se apresentam na Tabela 14 demonstra um ajuste adequado (Tabela A2) após a eliminação de efeitos (backward removal). O coeficiente de regressão do modelo (r^2) 0,63 é próximo do r^2 ajustado 0,56 ($<0,1$) mostrando que no modelo obtido, cerca de 63% da variância total em torno da média é explicada pela respetiva equação, ficando 37% atribuída aos resíduos e, que a exclusão dos efeitos considerados foi adequada para a qualidade de previsão das respostas. Assim, o modelo que descreve a redução de Micro 30 °C, em função de T e t, com eliminação da variável t (efeitos quadrático, linear e interação), revela um carácter preditivo e reprodutibilidade dos erros experimentais, dentro da gama de variação estudada.

Tabela 14 - Coeficientes de regressão e respectivas probabilidades do modelo quadrático para a redução de Micro 30 °C.

| Fator | Micro 30 °C ($r^2 = 0,63$; $r^2_{ajust} = 0,56$) | |
|----------------|---|----------|
| | Coeficiente | p |
| Interseção | -5,74284 | 0,015652 |
| T | 0,26266 | 0,011016 |
| T ² | -0,00239 | 0,022755 |

De acordo com a Tabela 14 verifica-se que a variação da temperatura (efeitos linear e quadrático) é a única variável com efeito significativo ($p < 0,05$) na eliminação da microbiota dos frutos.

As representações gráficas para a resposta de Micro 30 °C geradas pelo modelo quadrático em função das variáveis independentes encontram-se na Figura 12.

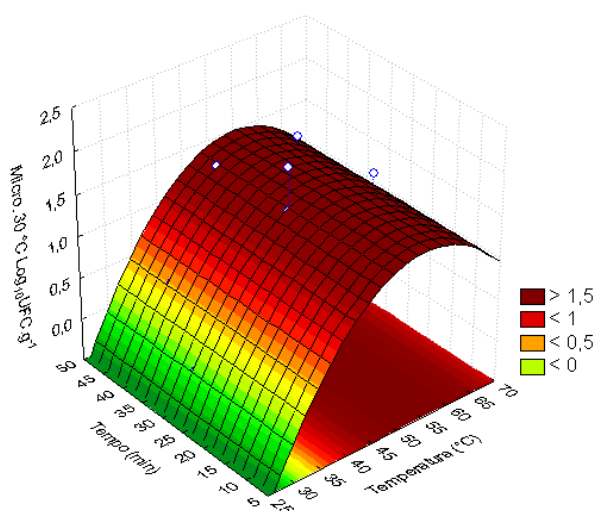


Figura 12 - Superfície de resposta para a redução de Micro a 30 °C (projeção no ponto central).

$$\text{Micro } 30\text{ }^{\circ}\text{C} = -5,74 + 0,26T - 0,002T^2 \quad (\text{Eq. 13})$$

Da Figura 12 verifica-se que a redução de Micro 30 °C aumenta com o aumento da temperatura, alcançando valores próximos de 1 ciclo log a partir da temperatura de 40 °C, independentemente do tempo de tratamento.

O modelo que expressa a eliminação parcial do grupo de bolores e leveduras (B&L) (Eq. 14), apresenta uma falta de ajuste não significativa (Tabela A2) e coeficientes de regressão do modelo (r^2) e do r^2 ajustado perto da unidade (0,84 e 0,74) revelando um carácter preditivo e uma boa reprodutibilidade dos erros experimentais, dentro da gama testada.

Tabela 15 - Coeficientes de regressão e respectivas probabilidades do modelo quadrático para a redução de B&L.

| Fator | B&L ($r^2 = 0,84$; $r^2_{\text{ajust}} = 0,74$) | |
|----------------|--|----------|
| | Coeficiente | p |
| Interseção | -13,6606 | 0,079092 |
| T | 0,5178 | 0,060063 |
| T ² | -0,0050 | 0,061799 |
| t | 0,0697 | 0,710588 |
| t ² | -0,0027 | 0,258678 |
| tT | 0,0028 | 0,368931 |

De acordo com os coeficientes de regressão (Tabela 15) verifica-se que as variações de temperatura (efeito linear) são as que exercem maior influência nas respostas geradas pelo modelo (Eq. 14).

O modelo que expressa a diminuição dos B&L em função das variáveis independentes é apresentado na Figura 13.

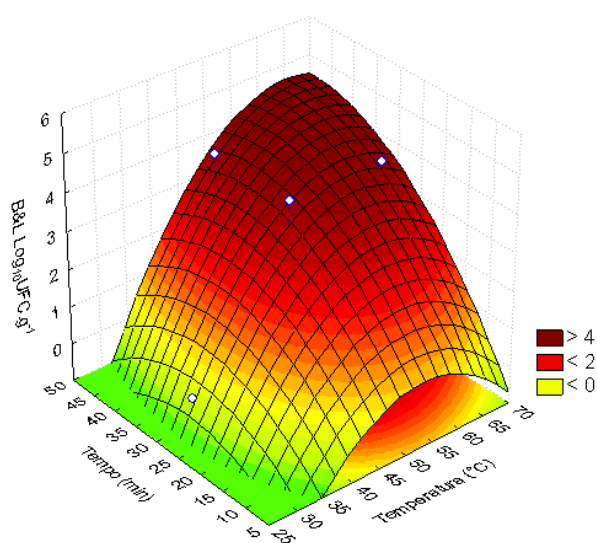


Figura 13 - Superfície de resposta para o parâmetro B&L (projeção no ponto central).

$$B\&L = -13,7 + 0,5T - 0,005T^2 + 0,07t - 0,003t^2 + 0,003tT \quad (\text{Eq. 14})$$

A redução de B&L é proporcional ao aumento da temperatura e do tempo de tratamento tendo a primeira variável um efeito mais significativo na variação das respostas geradas. Para valores de temperatura superiores a 40 °C e 40 min, o modelo prevê uma diminuição de B&L de cerca de 2 ciclos Log.

Conclusão

Os resultados de modelização dos atributos testados indicam que a solução de compromisso face os objetivos pretendidos - reduzir a microbiota inicial sem comprometer a qualidade em fresco é alcançada para valores de intensidade térmica na proximidade do binómio 40 °C / 40 minutos. Nesta intensidade prevê-se uma redução significativa da contaminação inicial dos frutos - 1 e 2 ciclos Log, para os grupos Micro 30 °C e B&L, respectivamente, e a manutenção das características sensoriais em fresco (cor, firmeza, pH e TSS).

3.4.2 Estudo de avaliação dos efeitos da integração de tratamentos: térmico e sonicação

Os efeitos de eliminação da microbiota alcançados através da aplicação de tratamentos térmicos moderados (binómio tempo, temperatura) e de tratamentos de sonicação (tempo e frequência) podem ser importantes no controlo de patologias bióticas pós-colheita quer se aplicados de forma singular ou combinada. Os níveis de descontaminação alcançados são dependentes da intensidade das variáveis do processo (temperatura, frequência de sonicação, duração do tratamento) e da natureza do vegetal em causa porquanto não se podem comprometer as características da qualidade em fresco. Esta questão remete para a fase de otimização das variáveis de processo.

Os mecanismos de ação letal induzidos por tratamentos distintos podem promover a adição e/ou sinergias nos efeitos de descontaminação e/ou permitir ainda baixar a intensidade necessária na aplicação singular de um deles

Objetivo e delineamento experimental

Este ensaio teve por objetivo verificar se os efeitos da combinação do tratamento térmico (40 °C, 40 min) com a sonicação (42 kHz, 40 min) acrescem aos efeitos do Top singular na diminuição da microbiota sem alterar os atributos da qualidade em fresco.

Para o efeito foram constituídas quatro tipos de amostras segundo um delineamento do tipo fatorial completo, identificando-se como variáveis independentes a aplicação de tratamento térmico (Top; 40 °C, 40 min) e de ultrassons (US; 42 kHz, 40 min), tal como se apresenta Tabela 16.

Tabela 16 - Delineamento experimental do ensaio.

| Tratamentos | Condições | Id. amostras |
|------------------------------------|--|--------------|
| Tratamento térmico singular | Imersão dos frutos em água a 40 °C, durante 40 min. | Top |
| Sonicação singular | Imersão dos frutos em água à temperatura ambiente, durante 40 min à frequência 42 kHz. | US |
| Termosonicação | Imersão dos frutos em água a 40 °C, durante 40 min à frequência 42 kHz. | Top x US |
| Sem tratamento | Frutos não tratados | C |

Para cumprir este ensaio foram selecionados ca 6 kg de frutos (procedimento 3.1.2) tendo-se cumprido os procedimentos descritos na Figura 14.

Os tratamentos de sonicação foram realizados segundo o procedimento 3.1.4, os tratamentos térmicos pelo procedimento 3.1.3 e a integração dos dois segundo o procedimento 3.1.5. As amostras resultantes (triplicados) foram avaliadas face ao seguinte protocolo: cor CIELab (carepa e polpa), firmeza (pico de força máximo), teor de sólidos solúveis, pH, contagens de microrganismos a 30 °C, bolores e leveduras.

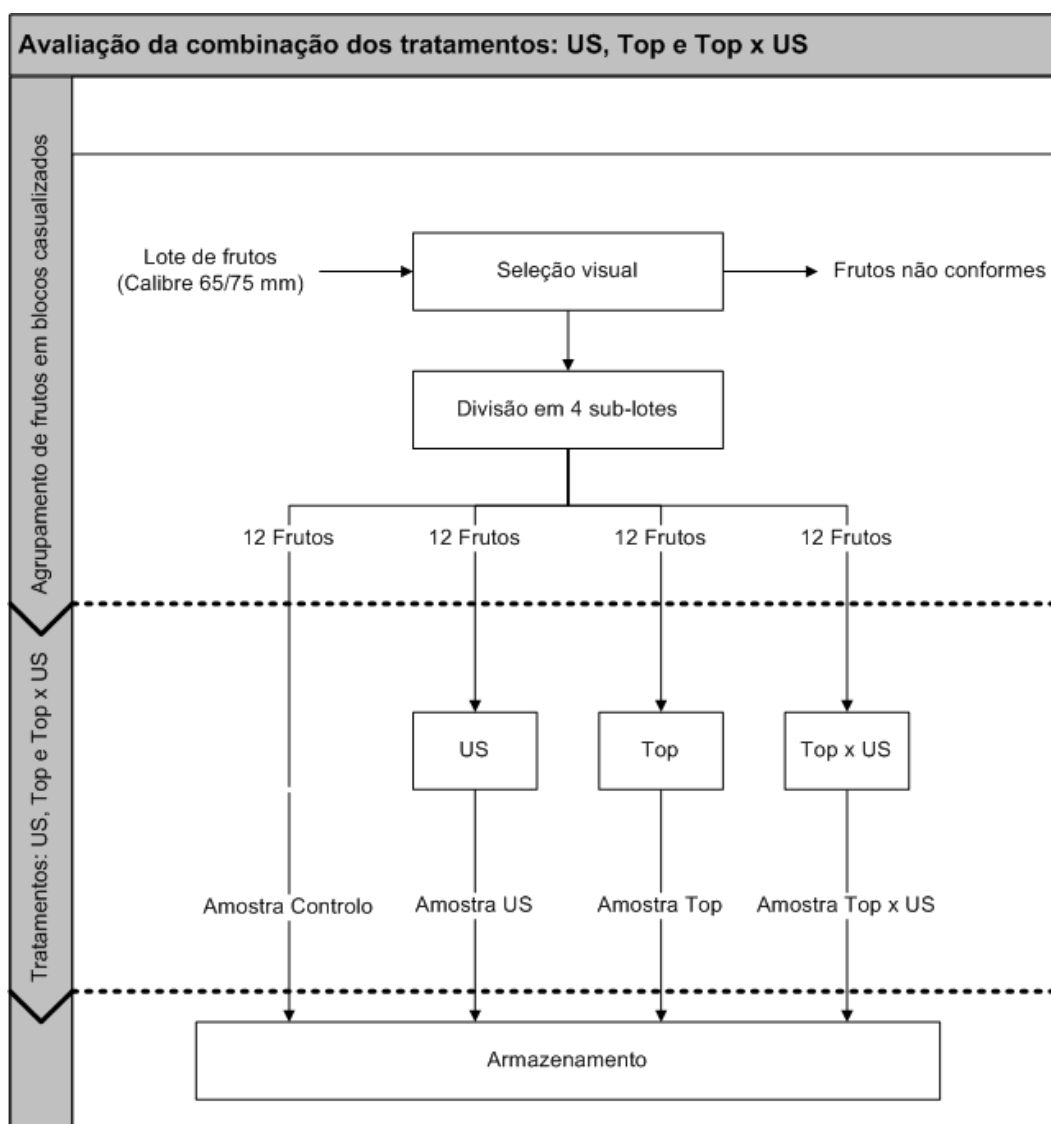


Figura 14 - Diagrama do delineamento experimental da aplicação dos tratamentos: ultrassons (US), térmico (Top) e combinação (Top x US).

Resultados e discussão

Cor

Na Figura 15 são apresentados os valores médios dos atributos de cor (tonalidade °h da carepa a) e índice de escurecimento da polpa b)) das amostras.

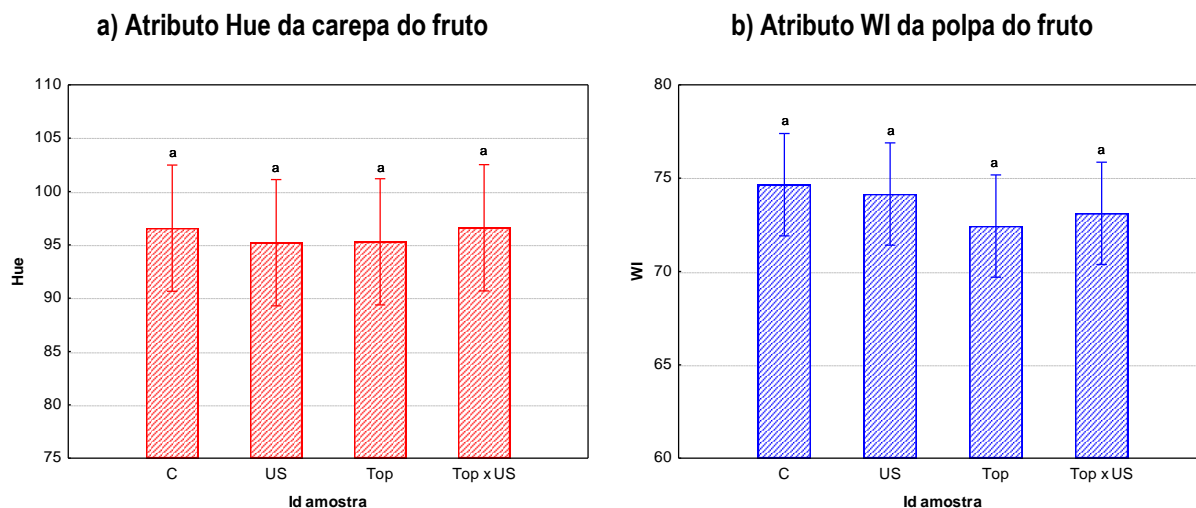


Figura 15 - Efeitos singulares e combinados dos tratamentos térmico e de sonicação nos atributos de cor a) tonalidade da carepa °h e b) Índice de escurecimento da polpa WI. Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

A Figura 15 mostra que não se verificaram diferenças significativas nos atributos de cor considerados (°h e WI) declarando a ausência de efeitos dos tratamentos (efeito singular e integrado) relativamente à alteração da cor dos frutos sem tratamento quer no exterior (carepa) como no interior (polpa). Assim qualquer dos tratamentos em consideração nas intensidades testadas não interfere com as características de cor dos frutos em fresco correspondendo à situação desejada.

Firmeza

Os valores médios de firmeza (pico de força máxima) entre amostras apresentados na Tabela 17 não revelam diferenças significativas entre si traduzindo igualmente a ausência de efeitos dos tratamentos térmico, sonicação e respetiva integração face à firmeza dos frutos em fresco (não tratados).

Tabela 17 - Registos médios (\pm DP) relativos ao atributo firmeza após tratamentos.

| Id. da amostra | Firmeza |
|---|-----------------------------|
| C | 10,3 ^a \pm 1,7 |
| US | 9,4 ^a \pm 2,1 |
| Top | 8,9 ^a \pm 2,5 |
| Top x US | 9,4 ^a \pm 1,5 |
| Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey). | |

pH e TSS

Na Tabela 18 são apresentados os valores médios de pH e TSS das amostras submetidas aos tratamentos: térmico (Top), ultrassons (US), tratamentos combinados (Top x US) face a amostras de pera não tratada (C) após tratamento.

Tabela 18 - Registos médios (\pm DP) relativos ao atributo de pH e TSS após tratamentos.

| Id. da amostra | pH | TSS |
|---|----------------------------|-----------------------------|
| C | 4,8 ^a \pm 0,1 | 13,1 ^a \pm 0,5 |
| US | 4,7 ^a \pm 0,1 | 13,1 ^a \pm 0,4 |
| Top | 4,7 ^a \pm 0,1 | 13,4 ^a \pm 1,3 |
| Top x US | 4,6 ^a \pm 0,2 | 13,1 ^a \pm 0,6 |
| Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey). | | |

A ausência de efeitos dos tratamentos em consideração sobre os valores de pH e TSS dos frutos em fresco é mostrado na Tabela 18 pela igualdade estatística dos respetivos valores, entre amostras.

Contagens microbiológicas

Para quantificar o efeito de descontaminação alcançado pelos três tratamentos, apresenta-se na Figura 16 a variação da contaminação inicial avaliada na matéria-prima (C) face às contagens microbiológicas avaliadas nas amostras.

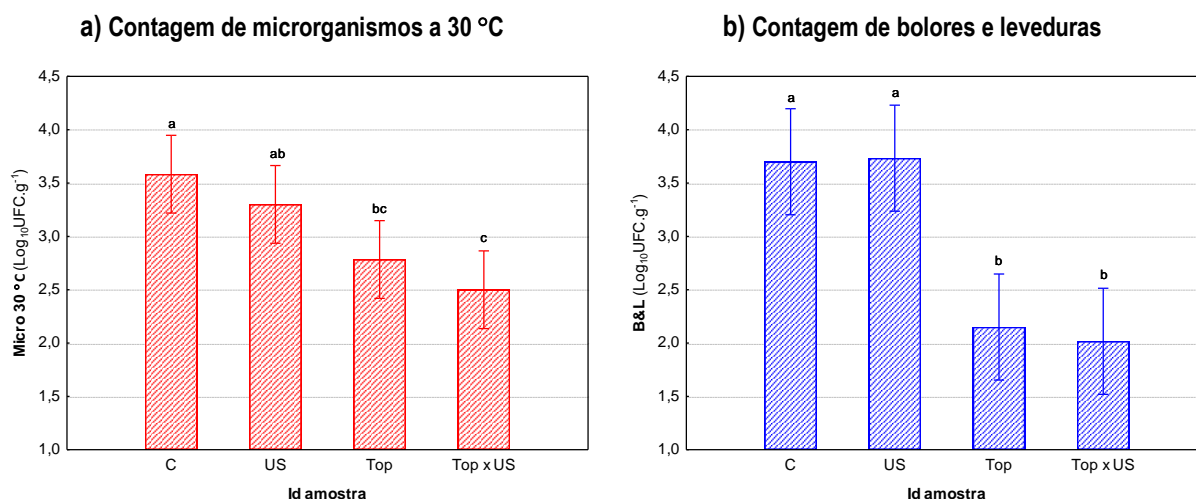


Figura 16 - Efeitos singulares e combinados do tratamento térmico e de sonicação nas contagens de a) microrganismos aeróbios a 30 °C (Micro 30 °C) e de b) bolores e leveduras (B&L). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

Da Figura 16a constata-se que as amostras submetidas ao tratamento de sonicação (US) apresentam contagens de microrganismos a 30 °C semelhantes à dos frutos não tratados revelando a ausência e efeitos de descontaminação na aplicação singular deste tratamento.

Ao contrário, as amostras tratadas termicamente Top e Top x US apresentaram diferenças significativas nas contagens de Micro 30 °C face à condição em fresco, em ca de 1 ciclo Log, sem diferenças ($p < 0,05$) entre si. Neste sentido infere-se que a termossonicação não acresceu efeitos na eliminação deste grupo microbiológico e que a diminuição observada deverá ser unicamente atribuída ao efeito do tratamento térmico.

Na Figura 16b os resultados mostram o mesmo tipo de comportamento entre amostras com a diferença que para o grupo de B&L os efeitos de descontaminação associados à aplicação de calor (efeito singular e combinado) foram mais acentuados alcançando valores de ca de 1,5 ciclos Log declarando tal como anteriormente a maior termosensibilidade deste grupo.

Conclusão

A aplicação de ultrassons na frequência testada de 42 kHz não verificou os efeitos previstos na promoção do efeito de descontaminação através do fenómeno de cavitação associado aos ultrassons.

Estes resultados permitiram confirmar os efeitos de descontaminação associados ao tratamento térmico na intensidade 40 °C durante 40 minutos sem prejuízo da qualidade sensorial da pera Rocha em fresco.

3.4.3 Estudo de avaliação dos efeitos da integração de tratamentos durante a armazenagem: térmico e biocontrole

Objetivo e delineamento experimental

Este ensaio teve por objetivo avaliar a eficácia da integração do tratamento térmico selecionado (Top) com a aplicação do antagonista comercial *Blossom Protect*TM (Top x A) no controle da podridão e na qualidade do fruto ao longo de 60 dias de armazenagem (7 °C).

Para cumprir o objetivo proposto constituíram-se três tipos de amostras Tabela 19 na sequência das etapas descritas na Figura 17.

Tabela 19 - Identificação das amostras e respectivos tratamentos.

| Tratamentos | Condições | Id. amostras |
|---|---|--------------|
| Tratamento térmico | Imersão dos frutos em água a 40 °C, durante 40 min. | Top |
| Integração de tratamentos: Térmico x Biocontrole | Imersão dos frutos em água a 40 °C, durante 40 min e de seguida imersão dos frutos na solução de biocontrole com $\sim 10^8$ UFC.L ⁻¹ , durante 1 min. | Top x A |
| Sem tratamento | Frutos não tratados | C |

Após seleção visual (procedimento 3.1.2), o lote inicial foi dividido aleatoriamente em sub-lotes para a constituição das amostras (Tabela 19). O tratamento térmico foi executado segundo o procedimento 3.1.3. No tratamento de integração os frutos foram preparados segundo os procedimentos 3.1.3 e 3.1.6. As amostras (em triplicado) foram posteriormente armazenadas durante 60 dias (ca 7 °C em câmara Cryocell) até serem analisadas. A temperatura de 7 °C utilizada neste ensaio situou-se acima da condição real de armazenagem dos frutos no período pós-colheita (de 0 °C / 1 °C) de forma a encurtar o período de ensaio assumindo que o desenvolvimento microbiano é acelerado mas sem alteração significativa do respetivo padrão.

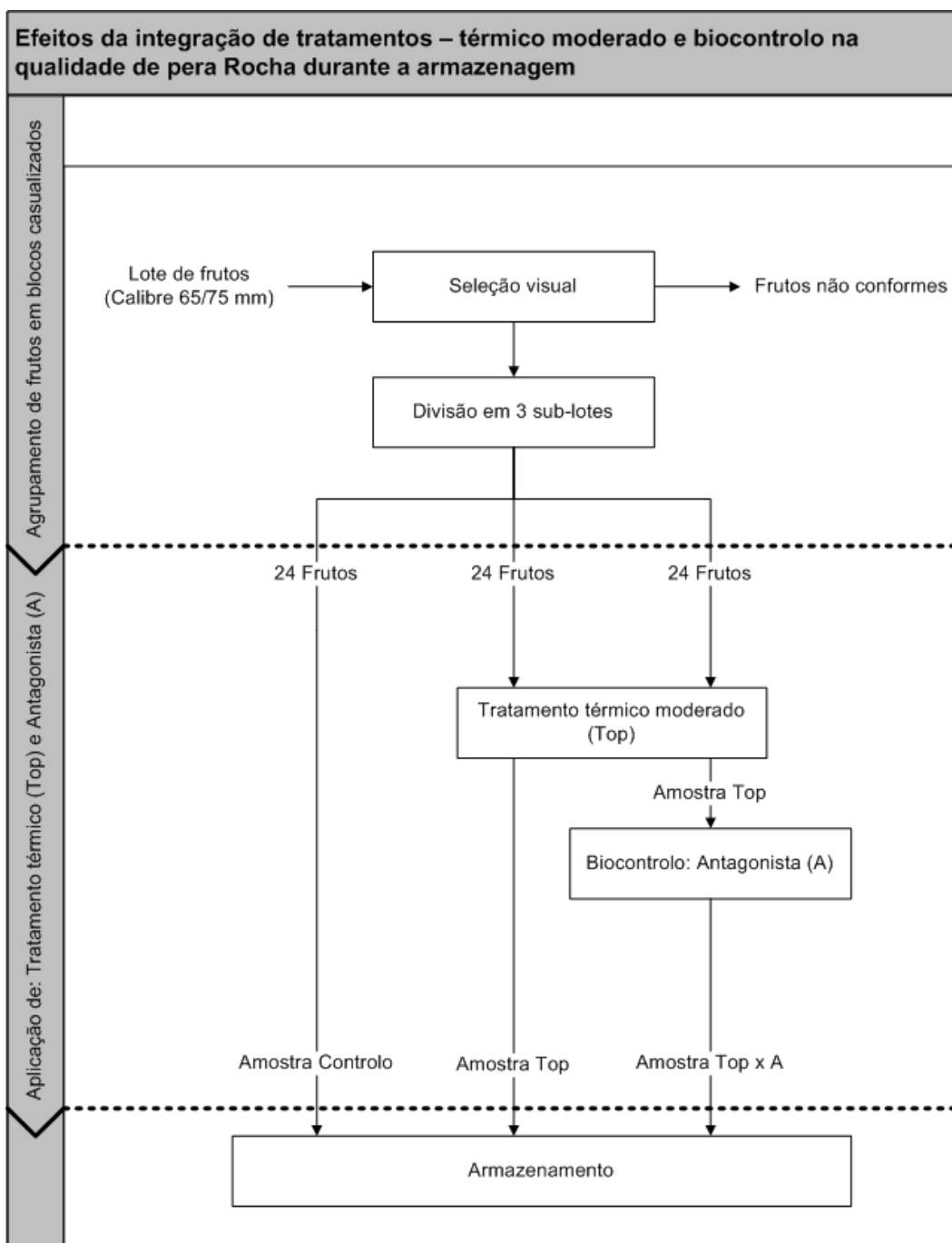


Figura 17 - Diagrama do delineamento experimental da aplicação de tratamentos: térmico (Top) e tratamento integrado com biocontrolo (Top x A) face a amostras de peras não tratadas (C).

Nos dias 0, 15, 45 e 60, as amostras foram avaliadas face aos seguintes atributos: perda de massa, cor CIELab (carepa e polpa), pH, TSS, CFT, contagem de microrganismos totais a 30 °C, contagem de bolores e leveduras e incidência de podridão (%) e análise sensorial informal.

Resultados e discussão

Perda de massa

Na Figura 18 apresentam-se os valores médios da perda de massa verificados nas amostras submetidas aos tratamentos: térmico (Top) e tratamento integrado (Top x A) face a amostras de pera não tratada (C) durante a armazenagem (60 dias, 7 °C).

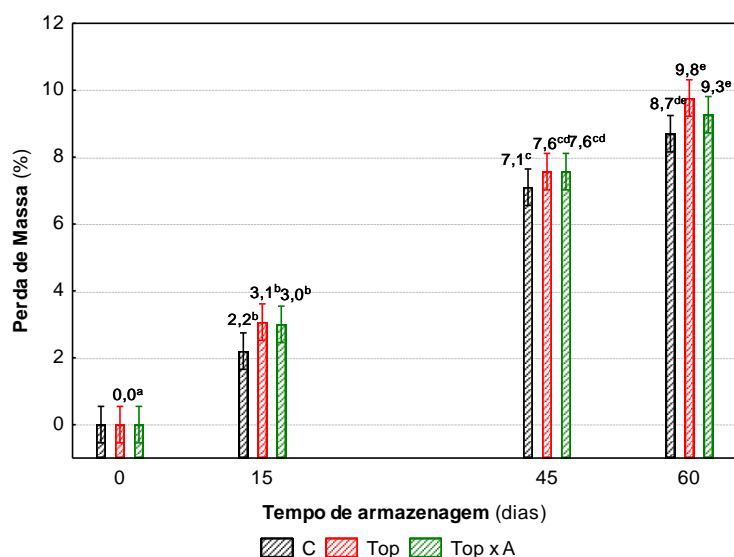


Figura 18 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) na perda de massa, durante 60 dias de armazenagem (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

As perdas de massa verificadas em todas as amostras (Figura 18) são crescentes com o avanço do período de armazenagem verificando-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes intervalos testados. Valores de ca de 10% alcançados ao final de 60 dias são muito elevados em comparação com valores de ca 3,8% contabilizados para o mesmo fruto ao fim de 4 meses (0 a 1 °C) assinalados por (Mitcham e Monzon, s.d.) e justificam-se pelas condições de armazenagem selecionadas neste ensaio principalmente no que se refere ao aumento do valor de temperatura. No entanto, como não se verificaram diferenças ($p > 0,05$) de perda de massa entre amostras tratadas e controlo conclui-se que os tratamentos testados não exerceram qualquer influência nesta resposta.

Atributos de cor CIELab

Na Figura 19 e Figura 20 são apresentados os valores da tonalidade (°h) da carepa e do índice de escurecimento (WI) da polpa relativos às amostras testadas respetivamente durante a armazenagem (60 dias, 7 °C).

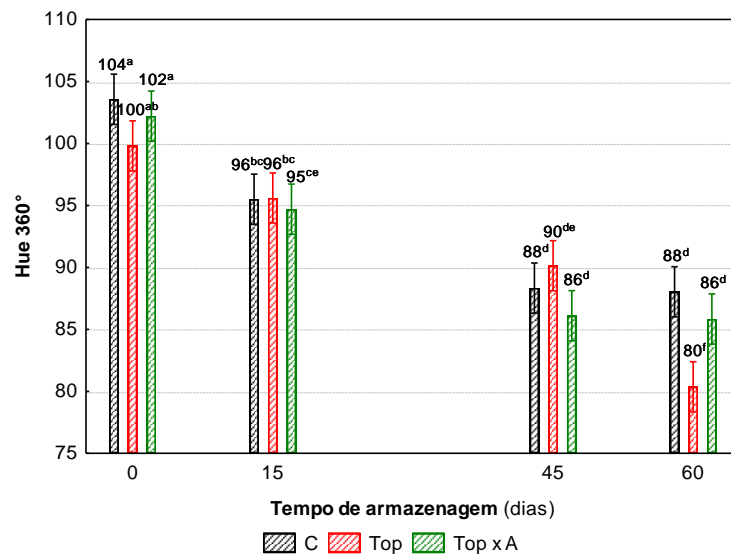


Figura 19 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) no atributo da tonalidade da carepa dos frutos, durante 60 dias de armazenamento (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

Os valores médios de °h (Figura 19) verificam uma diminuição significativa ($p < 0,05$) ao longo do período de armazenagem (decréscimo de ca 15% face ao dia 0), correspondente a uma variação da tonalidade verde para amarelo acastanhado tal como se verifica no curso do processo de amadurecimento pós-colheita do fruto. Por outro lado, em todas as datas avaliadas não se verificaram, entre amostras, variações significativas nos valores de °h com exceção da última data em que a amostra Top revelou valores inferiores ($p < 0,05$) face às restantes, sem justificação aparente. Neste sentido, o comportamento geral das amostras traduz a independência das variações da tonalidade face aos tratamentos em estudo mostrando apenas ser influenciadas pelo tempo de armazenagem.

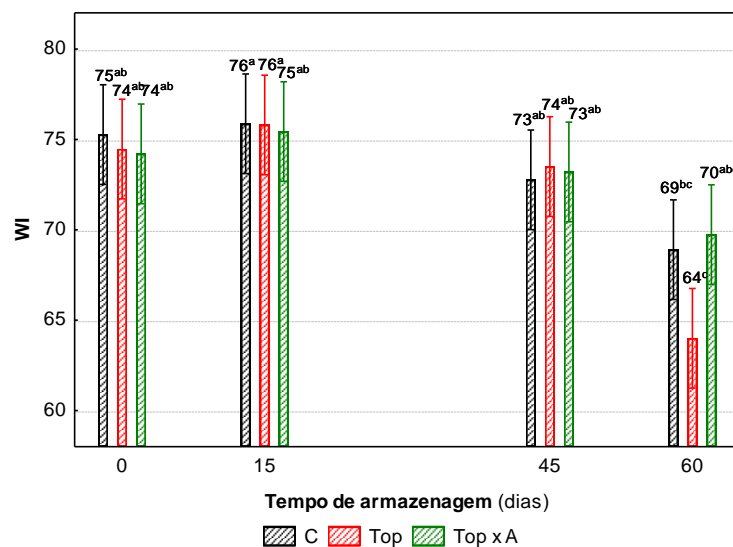


Figura 20 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) no atributo WI da polpa dos frutos, durante 60 dias de armazenamento (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

Os valores médios de WI apresentados na Figura 20 mostram variações não significativas ($p>0,05$) ao longo da armazenagem independentemente do tipo de amostras, com exceção da amostra Top em que se verifica uma diminuição significativa no último intervalo testado, sem justificação aparente. Apesar de não significativo ($p>0,05$) verifica-se uma tendência de escurecimento ao dia 60 para todas as amostras. Em geral este comportamento mostra que as variações do índice de escurecimento não foram influenciadas pelos tratamentos em estudo e mais uma vez estiveram na dependência exclusiva do período de armazenagem.

Firmeza

Na Figura 21 são apresentados os valores médios dos picos de força máxima (firmeza) das amostras submetidas aos tratamentos: térmico (Top) e tratamento integrado (Top x A) face a amostras de pera não tratada (C) durante a armazenagem (60 dias, 7 °C).

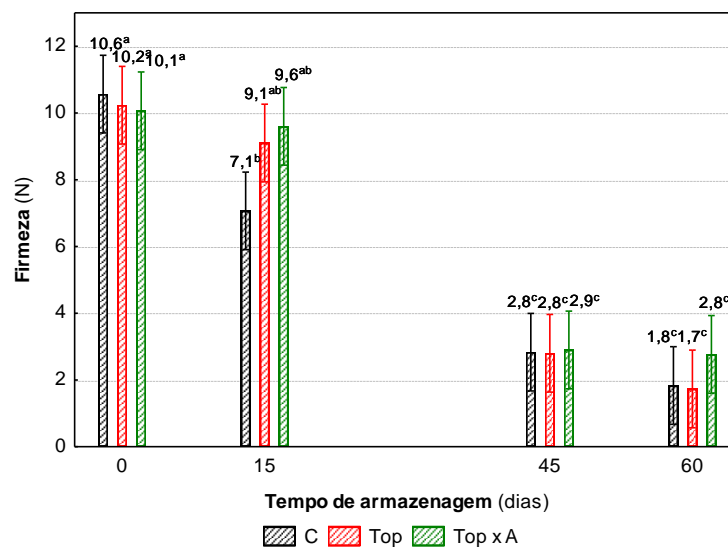


Figura 21 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) no atributo firmeza dos frutos, durante 60 dias de armazenamento (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

Verifica-se pela análise da Figura 21 que ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos valores médios de firmeza de todas as amostras a partir do 15º dia, correspondente diminuição a um decréscimo de ca 80% face ao dia 0, traduzindo o amolecimento do fruto. Dessa data em diante as amostras mantiveram os valores de firmeza sem variações significativas. Entre cada momento de análise não se verificaram diferenças ($p < 0,05$) entre amostras.

A evolução dos valores de firmeza não foi influenciado pelos tratamentos testados uma vez que não se verificaram diferenças ($p < 0,05$) na comparação entre amostras em todos os dias avaliados.

pH e TSS

Na Tabela 20 são apresentados os valores médios de pH e TSS das amostras em estudo (C, Top e Top x A) durante a armazenagem (60 dias, 7 °C).

As amostras não sofreram variações significativas ($p > 0,05$) nos valores de pH em função do tempo de armazenagem e dos tratamentos testados. Assinala-se apenas uma exceção para a amostra Top x A em que ao 45º dia verificou uma diminuição de 0,5 unidades face à data anterior. Acresce que a variação média nos valores de pH das amostras situada em torno de 0,7 unidades assinala diferenças com significado fisiológico pouco expressivo para o fruto.

Tabela 20 - Registos médios (\pm DP) relativos aos atributos de pH e TSS durante o armazenamento (60 dias, 7 °C).

| Id Amostra | Armazenagem | pH | TSS |
|----------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
| C | 0 | 4,6 ^{ab} \pm 0,2 | 10,9 ^a \pm 0,3 |
| | 15 | 4,8 ^{ab} \pm 0,1 | 11,9 ^a \pm 0,5 |
| | 45 | 4,5 ^{ab} \pm 0,1 | 11,4 ^a \pm 0,1 |
| | 60 | 4,7 ^{ab} \pm 0,1 | 11,9 ^a \pm 0,4 |
| Top | 0 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 12,0 ^a \pm 0,7 |
| | 15 | 4,6 ^{ab} \pm 0,2 | 11,9 ^a \pm 0,5 |
| | 45 | 4,6 ^{ab} \pm 0,1 | 11,6 ^a \pm 1,2 |
| | 60 | 4,8 ^{ab} \pm 0,2 | 13,4 ^a \pm 1,1 |
| Top x A | 0 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 11,8 ^a \pm 1,5 |
| | 15 | 4,9 ^a \pm 0,2 | 11,8 ^a \pm 1,7 |
| | 45 | 4,4 ^b \pm 0,1 | 12,3 ^a \pm 1,2 |
| | 60 | 4,5 ^{ab} \pm 0,1 | 12,4 ^a \pm 0,9 |

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey).

As variações nos valores de TSS das amostras apresentaram um comportamento semelhante mostrando a manutenção dos valores iniciais quer sob efeito da armazenagem quer sob efeito dos tratamentos, em que as diferenças não ultrapassam os 2,5 °Brix.

Apreciação sensorial

Na Figura 22 são apresentados os resultados médios da avaliação sensorial (apreciação da cor, firmeza e apreciação global) das amostras submetidas aos tratamentos: térmico (Top) e tratamento integrado (Top x A) face a amostras de pera não tratada (C) durante a armazenagem (60 dias, 7 °C), tendo em conta a classificação de 3 como limiar de aceitação.

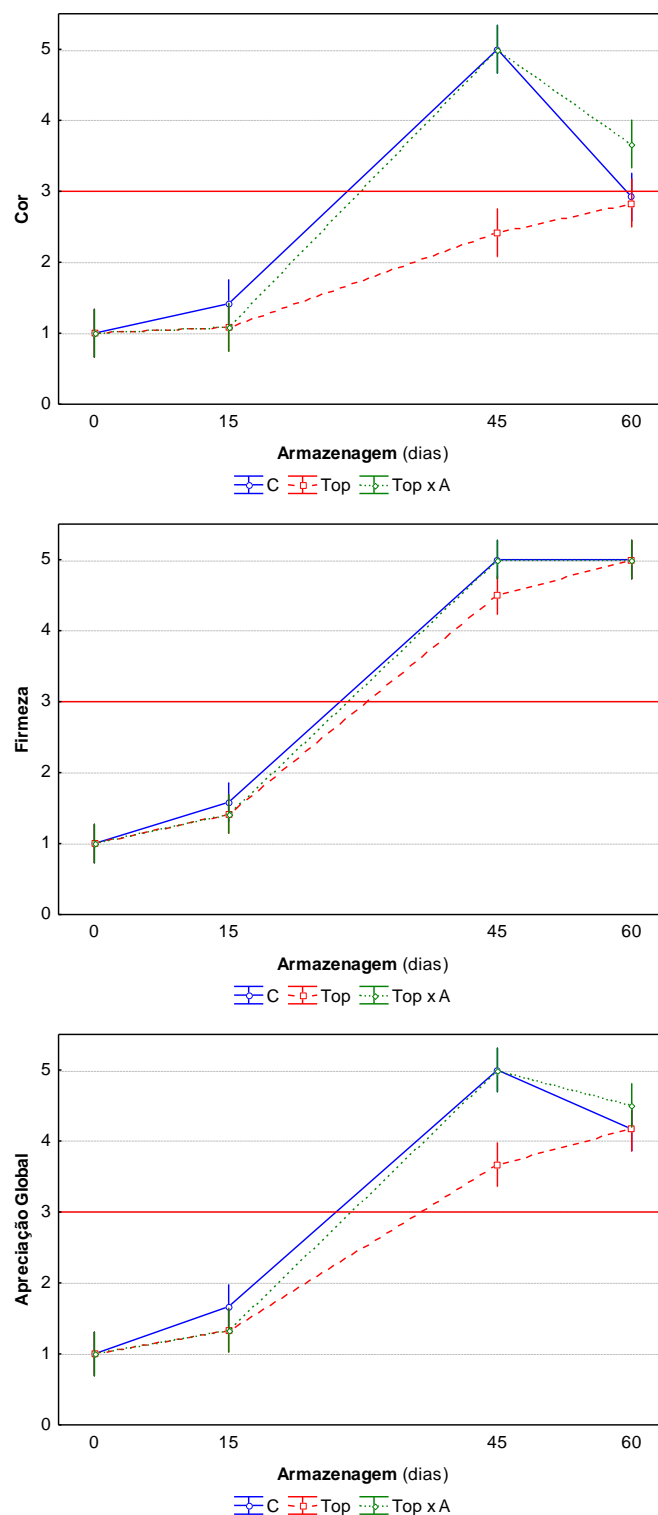


Figura 22 - Análise sensorial dos atributos cor, firmeza e apreciação global (C vs Top e Top x A) durante o armazenamento (60 dias, 7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Escala de cor: 1- Verde, 2-Moderadamente verde, 3-Ligeiramente amarelo, 4-Amarelo, 5-Amarelo escuro. Escala firmeza: 1-Muito firme; 2-Firme, 3- Moderadamente firme, 4-Mole, 5-Muito mole. Escala hedônica de apreciação global: 1-Muito bom, 2-Bom, 3-Suficiente (limite de aceitação), 4-Mau, 5-Muito mau.

Da análise sensorial (Figura 22) verifica-se que no período inicial ao 15º dia não existiram diferenças significativas ($p > 0,05$) na classificação das amostras para os três atributos testados, indicando neste período a manutenção da qualidade inicial dos frutos. Ao 45º dia, foi verificado um decréscimo acentuado ($p < 0,05$) em todos os atributos (atingindo a escala máxima de rejeição, 5) nas amostras C e Top x A que apresentaram uma evolução semelhante e significativamente diferente ($p < 0,05$) perante a amostra Top no atributo cor. De acordo com as observações sensoriais do painel, as amostras referidas (C e Top x A) foram penalizadas pela ocorrência de podridões visíveis. Após análise é possível especular que a rejeição das amostras aconteceu nos 27º e 29º dias (C e Top x A, respetivamente). Para o mesmo dia, na amostra Top, os atributos cor e firmeza já se encontravam na zona de rejeição apesar de não apresentarem podridões, para esta amostra perspetiva-se um aumento em ca de 7 dias face às amostras anteriores. No decorrer do armazenamento até ao dia 60, todas as amostras verificam uma contínua depreciação da cor, firmeza e, consequentemente, apreciação global. A baixa apreciação dos frutos ao fim dos 60 dias reflete a perceção de um escurecimento da carepa e um amolecimento acentuado das amostras. O aumento das classificações atribuídas à apreciação global reflete uma rejeição crescente dos frutos com o aumento da armazenagem.

Compostos fenólicos totais

A variação dos valores médios de compostos fenólicos totais ($\text{mg EAC} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) das amostras durante a armazenagem (60 dias, 7 °C) apresentada na Figura 23, revela um comportamento de estabilidade. Neste sentido não se verificaram diferenças significativas entre amostras ao longo da armazenagem traduzindo indiretamente que a capacidade antioxidante do fruto não foi influenciada pela natureza dos tratamentos aplicados nem pelas condições de armazenagem.

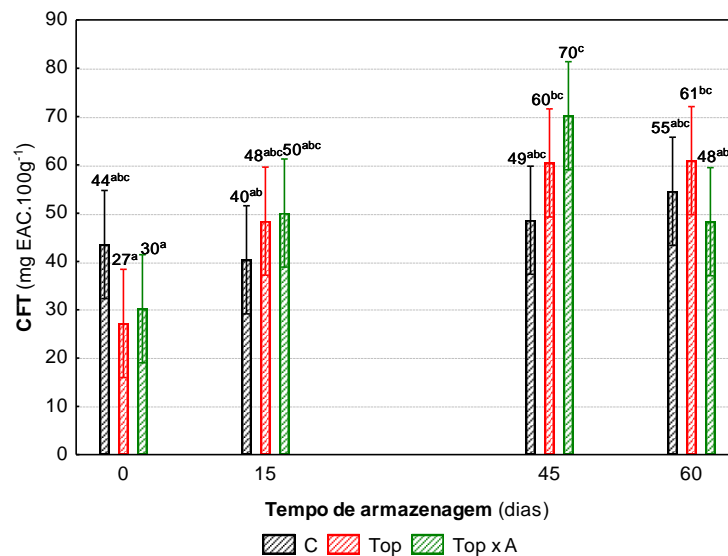


Figura 23 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) na quantificação do teor de compostos fenólicos totais, durante 60 dias de armazenamento (7 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

Contagens microbiológicas

Na Figura 24 apresentam-se as contagens microbiológicas iniciais (tempo 0) de Micro 30 °C e B&L para as amostras submetidas aos tratamentos: térmico (Top) e tratamento integrado (Top x A) face a amostras de pera não tratada (C).

Pela observação da Figura 24 verifica-se que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) relativamente aos Micro 30 °C entre as amostras tratadas (Top e Top x A) e a amostra controlo (C), apesar da diminuição de 0,8 Log referente à amostra Top face à controlo. Para os Micro 30 °C não se verificou efeito ($p > 0,05$) dos tratamentos aplicados. Em termos de B&L verifica-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as ambas as amostras tratadas (Top e Top x A) relativamente à amostra controlo (C), sendo que a amostra Top x A apresentou uma redução de 1,2 $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$ face à amostra C. Esta situação não expressa a variação esperada tendo em conta que a adição da levedura (biocontrolo) deveria conduzir ao aumento das contagens iniciais de B&L. A amostra Top foi a que apresentou maior eficiência na redução ($p < 0,05$) (99,9%) deste grupo obtendo uma contagem de $< 10 \text{ UFC.g}^{-1}$. Verificou-se efeito significativo ($p < 0,05$) dos tratamentos na redução do grupo de B&L.

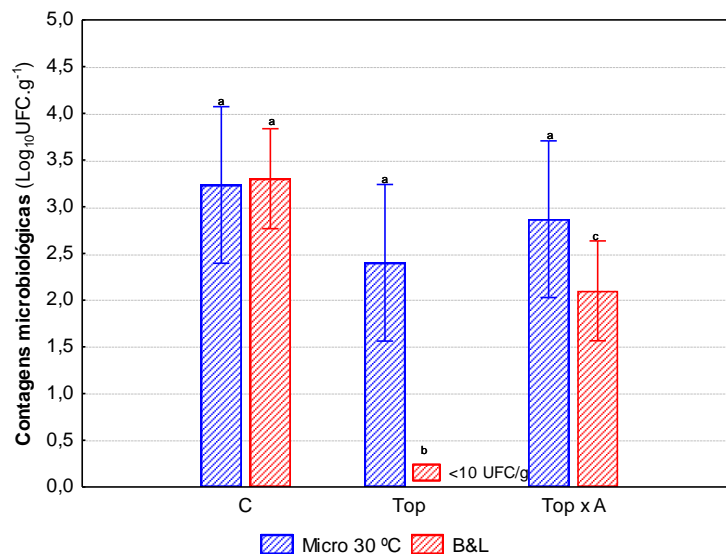


Figura 24 - Efeito da aplicação de tratamentos pós-colheita (C vs Top, Top x A) na contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C e de bolores e leveduras, após tratamento. Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

Incidência de podridão visível

Na Figura 25 é apresentado os resultados da incidência de podridão nas amostras submetidas aos tratamentos: térmico (Top) e tratamento integrado (Top x A) face a amostras de pera não tratada (C) durante a armazenagem (60 dias, 7 °C).

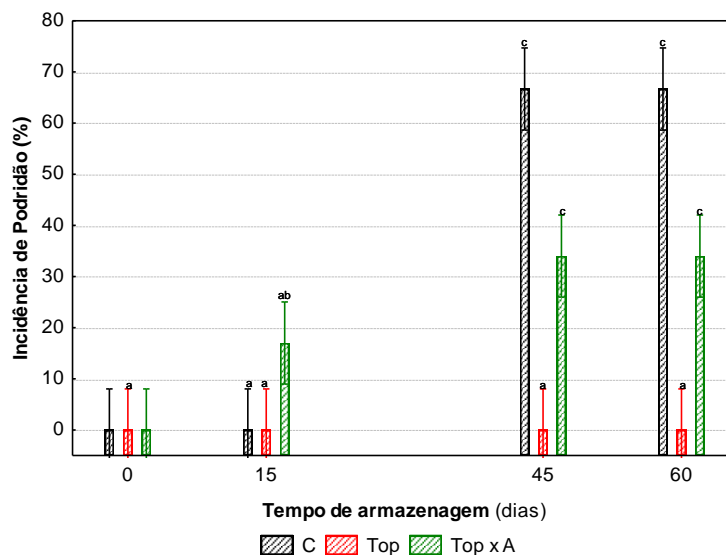


Figura 25 - Incidência de podridão visível (%) nas amostras tratadas (C vs Top, Top x A durante 60 dias de armazenagem (7 °C). Valores correspondem às médias acumulativas. Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Letras diferentes revelam diferenças significativas a 95% (Teste Tukey).

A incidência de podridão visível (Figura 25) (%) declara variações significativas em função dos tratamentos e do período de armazenagem (60 dias, 7 °C). As amostras Top mostraram um controlo da incidência de podridões visíveis durante todo o período de armazenamento que na comparação com as amostras sem tratamento (C), demonstra efeitos significativos na prevenção da incidência de podridão, a partir do dia 15. Relativamente à amostra de integração de tratamento térmico com antagonista (Top x A) revelou incidência de podridões ao fim do 15º dia não refletindo efeitos no controlo de podridões.

Conclusão

A integração de Top com biocontrolo (Top x A) não revelou efeitos acrescidos face à aplicação singular (Top). O tratamento térmico (Top; 40 °C, 40 min) demonstrou ser efetivo na descontaminação inicial dos frutos (reduções ~2 ciclos Log para o grupo de B&L) e para o controlo (100%) da incidência de podridão durante a armazenagem (7 °C, 60 dias). Acresce ainda ausência de efeitos na capacidade antioxidante dos frutos.

As perdas significativas de qualidade verificadas nas amostras, independentemente do tipo de tratamento considerado, foram dependentes do tempo de armazenagem e em consequência condicionadas pelas condições de temperatura atípicas de armazenagem (7 ° vs 0 °C). Nas condições reais de armazenagem da pera Rocha (0 °C) perspetiva-se que os efeitos deste tratamento sobre a fisiologia favoreçam a manutenção da qualidade em fresco e possibilitem a extensão do período de armazenagem pós-colheita.

3.4.4 Estudo do tratamento térmico moderado na aptidão da matéria-prima para processamento mínimo

Objetivo e delineamento experimental

Com este ensaio pretenderam-se avaliar os efeitos do tratamento térmico moderado (Top; 40 °C, 40 min) enquanto alternativa à descontaminação com hipoclorito de sódio (prática industrial; HIPO; 100 ppm x 1 min, pH 6) na descontaminação e como alternativa à aplicação de químicos de síntese na prevenção das reações de escurecimento enzimático de pera Rocha minimamente processada (quartos) durante a armazenagem (15 dias, 5 °C).

Para cumprir este objetivo prepararam-se dois tipos de amostras de frutos minimamente processados (Figura 26). As condições de tratamento da matéria-prima, foram para o tratamento térmico a condições previamente otimizada, binómio 40 °C, 40 min (Top) e para o tratamento com hipoclorito de sódio a utilização das respetivas soluções na concentração 100 ppm, durante 1 minuto (HIPO) a simular as condições praticadas na indústria (Tabela 21).

Tabela 21 - Identificação das amostras e respetivos tratamentos.

| Tratamentos | Condições | Id. amostras |
|-------------------------------------|--|--------------|
| Tratamento térmico | Imersão dos frutos em água a 40 °C, durante 40 min. | Top |
| Tratamento com hipoclorito de sódio | Imersão dos frutos previamente processados em quartos numa solução de hipoclorito de sódio (100 ppm, 1 min , pH 6) | HIPO |

A partir de um lote homogéneo selecionado segundo procedimento 3.1.2, foram constituídos dois tipos de amostras (6 frutos cada) para quatro momentos de análise. Para a constituição das amostras Top as peras foram submetidas, em inteiro, ao tratamento térmico (procedimento 3.1.3), como tratamento de descontaminação alternativo e posteriormente minimamente processadas (procedimento 3.1.7). Na preparação das amostras HIPO os frutos foram submetidos às operações de processamento mínimo (procedimento 3.1.7) tal como se procede na prática industrial. Nos dias 0, 3, 7 e 15 de armazenagem foram avaliados os seguintes atributos: cor CIELab (superfícies descascada e cortada), pH, firmeza, teor de sólidos solúveis, conteúdo fenólico total, contagem de microrganismos totais a 30 °C, contagem de bolores e leveduras e análise sensorial informal.

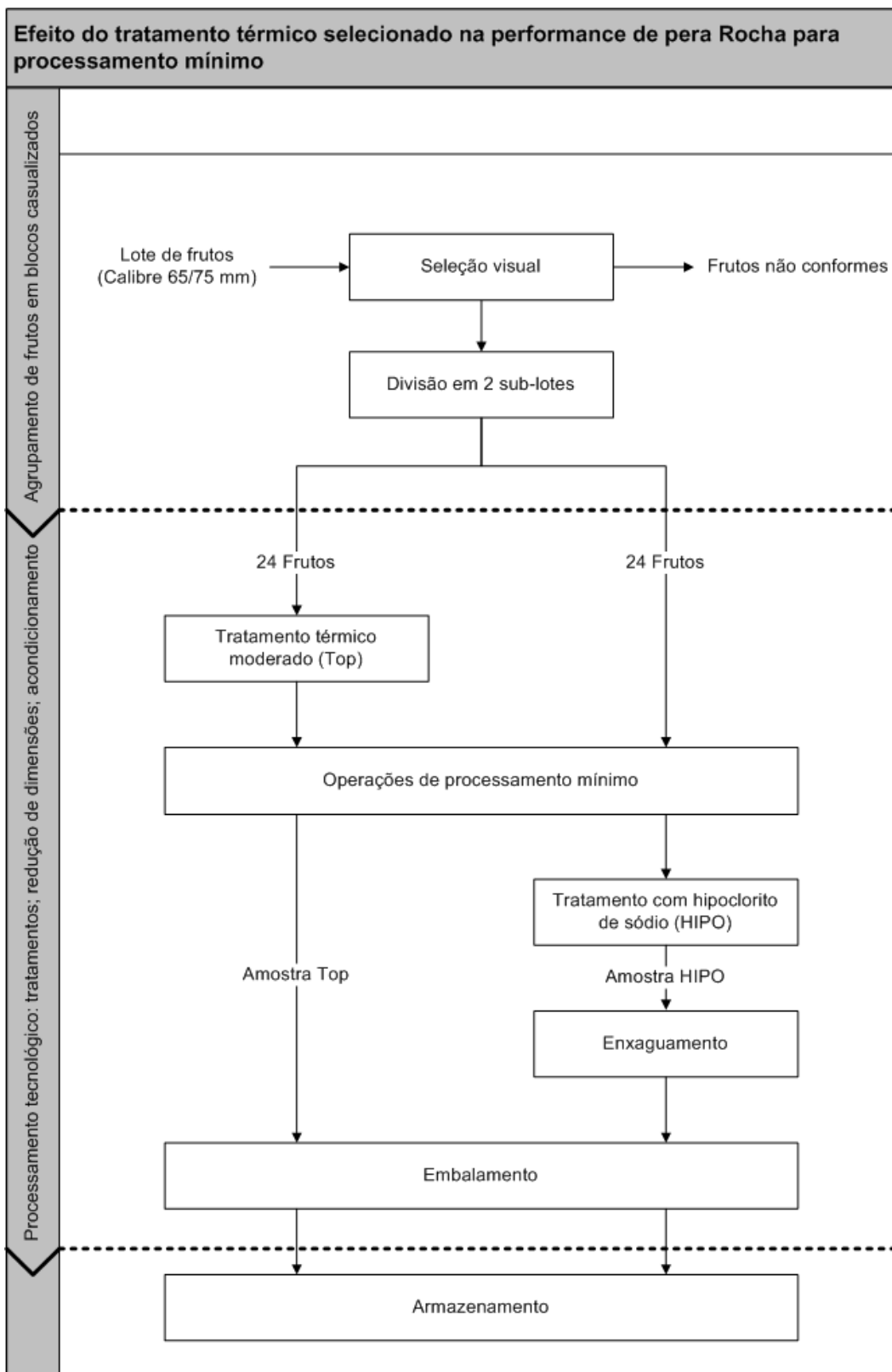


Figura 26 - Diagrama do delineamento experimental da aplicação de tratamentos: térmico (Top) e hipoclorito de sódio (HIPO) no processamento mínimo de pera Rocha.

Resultados e discussão

pH e TSS

Na Tabela 22 apresentam-se os valores médios de pH e TSS das amostras de pera Rocha minimamente processadas, durante a armazenagem (15 dias, 5 °C).

Tabela 22 - Resultados médios (\pm DP) de pH, TSS das amostras HIPO e Top ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C).

| Identificação de amostras | Datas de análise (dias) | pH | TSS |
|---------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| HIPO | 0 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 10,9 ^a \pm 0,8 |
| | 3 | 4,7 ^a \pm 0,0 | 10,9 ^a \pm 0,6 |
| | 7 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 10,9 ^a \pm 0,1 |
| | 15 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 10,9 ^a \pm 0,2 |
| Top | 0 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 11,0 ^a \pm 0,4 |
| | 3 | 4,7 ^a \pm 0,0 | 10,6 ^a \pm 0,4 |
| | 7 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 10,5 ^a \pm 0,4 |
| | 15 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 11,1 ^a \pm 0,5 |

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey).

Os valores de pH e de teor de sólidos solúveis entre amostras e durante a armazenagem não revelaram diferenças significativas ($p>0,05$) declarando a manutenção dos valores iniciais, independentemente da natureza do tratamento e do período de armazenagem.

Cor

Na Figura 27 a) e b) as variações do índice de escurecimento (WI) nas amostras (HIPO e Top) durante a armazenagem (15 dias, 5 °C), assinalam para as duas zonas avaliadas (superfícies descascadas e cortadas) níveis de escurecimento muito distintos. Assim nas superfícies descascadas (Figura 27a) a gama de variação de WI (ca de 72 a 67) traduz níveis de escurecimento mais acentuados dos que foram avaliados nas superfícies cortadas (Figura 27b). Esta diferença prende-se com a natureza dos tecidos que se expõem em cada uma das situações correspondendo as superfícies descascadas aos tecidos subjacentes ao pericarpo e, nos segundos aos tecidos do mesocarpo do fruto. A suscetibilidade destes dois tipos de tecidos ao escurecimento é conhecida e justificada pelos fatores que condicionam as reações de escurecimento: enzima polifenoloxidase (PPO) e substratos fenólicos. Assim nos tecidos próximos do pericarpo do fruto foram caracterizados níveis de atividade enzimática e teores fenólicos mais elevados bem como a presença de isoformas da PPO mais ativos, relativamente aos tecidos do mesocarpo (Abreu *et al.*, 2010).

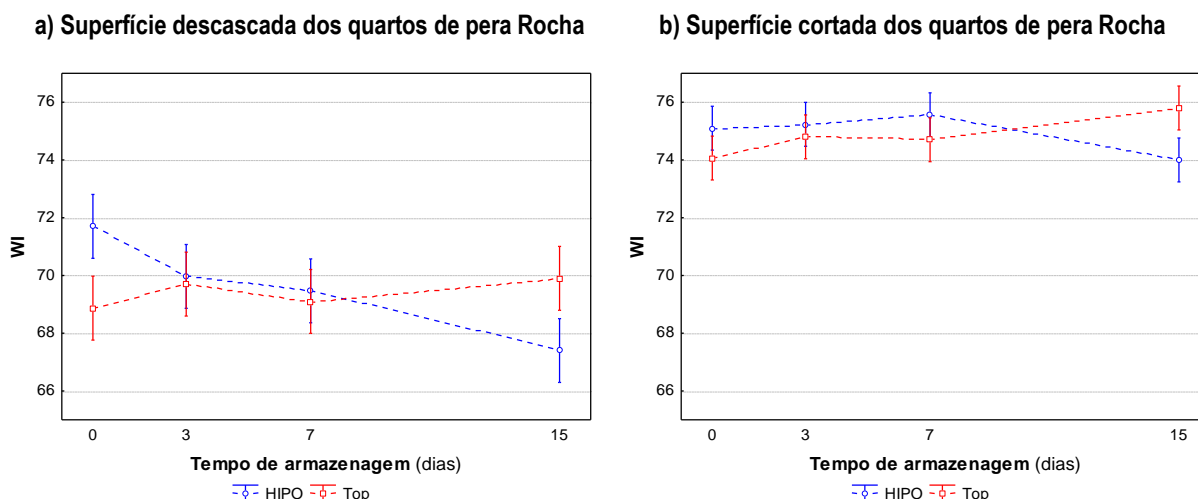


Figura 27 - Variação do índice de escurecimento (WI) das amostras de pera Rocha minimamente processadas (HIPO e Top) ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C). a) Superfície descascada dos quartos; b) Superfície cortada dos quartos. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

Por outro lado é possível observar que nas superfícies descascadas a variação de WI ao longo do total de armazenagem é significativa nas amostras HIPO, revelando as amostras Top uma estabilidade (variações não significativas) ao longo do período testado. Nas superfícies cortadas os níveis de escurecimento não registam alterações ($p < 0,05$) durante a armazenagem, independentemente do tipo de amostras.

Análise sensorial

Na Figura 28, são apresentados as classificações obtidas na avaliação sensorial das amostras durante a armazenagem (15 dias, 5 °C), relativas à apreciação da cor e à apreciação global. As classificações atribuídas à firmeza são apresentadas na Tabela D2.

As classificações atribuídas à firmeza das amostras permaneceram sem variações significativas ao longo da armazenagem (Tabela D2) independentemente do tipo de amostras. Este facto traduz que a apreciação deste atributo não influenciou a avaliação sensorial de pera *Rocha* minimamente processada, tal como normalmente acontece com outros frutos (ex. kiwi minimamente processado) em que amolecimentos no decorrer da armazenagem podem ser críticos para a rejeição do produto. Por outro lado a semelhança de comportamentos evolutivos nas classificações sensoriais expressas nos gráficos da Figura 28 a) e b) revelam que as classificações atribuídas à apreciação global estiveram maioritariamente na dependência dos juízos da apreciação da cor.

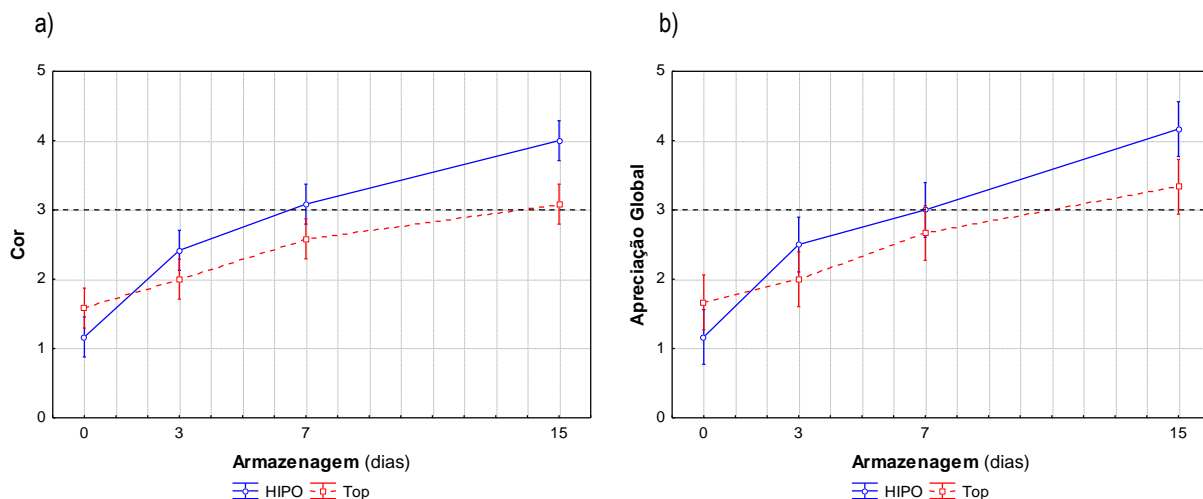


Figura 28 - Análise sensorial dos atributos a) cor e b) apreciação global, das amostras de pera Rocha minimamente processada referente à superfície descascada (HIPO e Top) ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C). Bandas de variação correspondem aos intervalos de confiança a 95%. Escala de cor: 1-Claro, 2-Moderadamente claro, 3-Ligeiramente escuro, 4-Escuro, 5-Muito escuro. Escala hedônica de apreciação global: 1-Muito bom, 2-Bom, 3-Suficiente (limite de aceitação), 4-Mau, 5-Muito mau.

Da Figura 28 a) o aumento dos registos ao longo da armazenagem revela que os provadores foram sensíveis ao escurecimento / acastanhamento das amostras conseguindo distinguir a partir do 7º dia (inclusive) níveis de escurecimento mais acentuados para as amostras HIPO. Acresce que estas amostras ao dia 7 apresentam níveis de aceitação no limiar de aceitação (âncora 3) declarando a rejeição sensorial das mesmas daí em diante. Nas amostras Top a proximidade à âncora 3 foi verificada ao 11º dia de armazenagem traduzindo a aceitação das mesmas durante quase todo o período testado.

Firmeza

Na Figura 29 são apresentados os valores médios dos picos de força máxima (firmeza) das amostras de pera Rocha minimamente processadas, referentes aos tratamentos: HIPO e Top durante a armazenagem (15 dias, 5 °C).

A manutenção dos valores de firmeza (pico de força máximo)($p > 0,05$) nos dois tipos de amostras ao longo da armazenagem corrobora os resultados da avaliação sensorial obtida pelo painel de provadores, consolidando o fato de que a variação da firmeza da pera Rocha não constitui um atributo crítico no âmbito deste tipo de processamento.

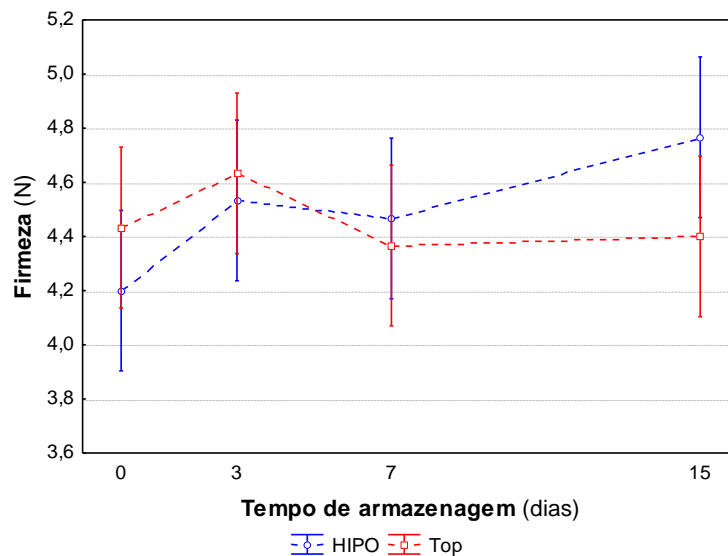


Figura 29 - Variação da firmeza (pico de força máxima, N) das amostras de pera Rocha minimamente processadas (HIPO e Top) ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

Compostos fenólicos totais

O teores de compostos fenólicos totais (CFT) nas amostras de pera Rocha minimamente processadas durante a armazenagem (15 dias, 5 °C) (Figura 30), a variar na gama 33-54 mg EAC 100 g⁻¹, não revelaram diferenças significativas entre amostras (Top e HIPO).

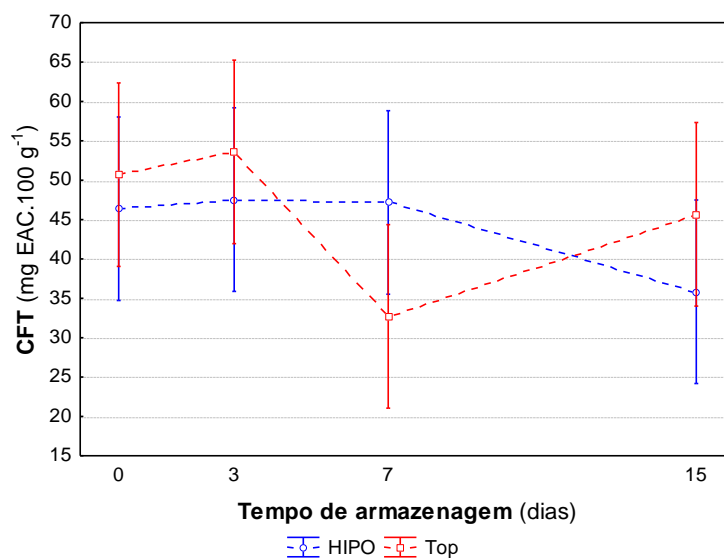


Figura 30 - Variação do conteúdo fenólico total (CFT) das amostras de pera Rocha minimamente processadas (HIPO e Top) ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

Esta manutenção exprime indiretamente a manutenção da capacidade antioxidante das amostras situação que é desejável face à garantia das propriedades funcionais do produto.

Contagens microbiológicas

Para quantificar o efeito de descontaminação alcançado pelos dois tratamentos apresenta-se a variação da contaminação inicial avaliada na matéria-prima face às contagens microbiológicas avaliadas nas amostras HIPO e Top após processamento mínimo (Figura 31). O decréscimo significativo ($p < 0,05$) registado nas contagens de microrganismos a 30 °C e de bolores e leveduras entre a amostra controlo (C) e as amostras tratadas (Top e HIPO) mostra que ambos os tratamentos exerceram efeitos de descontaminação na microbiota inicial do fruto.

Entre as amostras (Top e HIPO) constatou-se o mesmo nível de contaminação após tratamento ($p > 0,05$) relativo aos Micro 30 °C. No entanto o Top teve um efeito mais pronunciado na eliminação do grupo de B&L, apresentando as mesmas contagens inexpressivas de $< 10 \text{ UFC.g}^{-1}$ em comparação com as amostras HIPO que verificaram ca de $1,7 \text{ Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$.

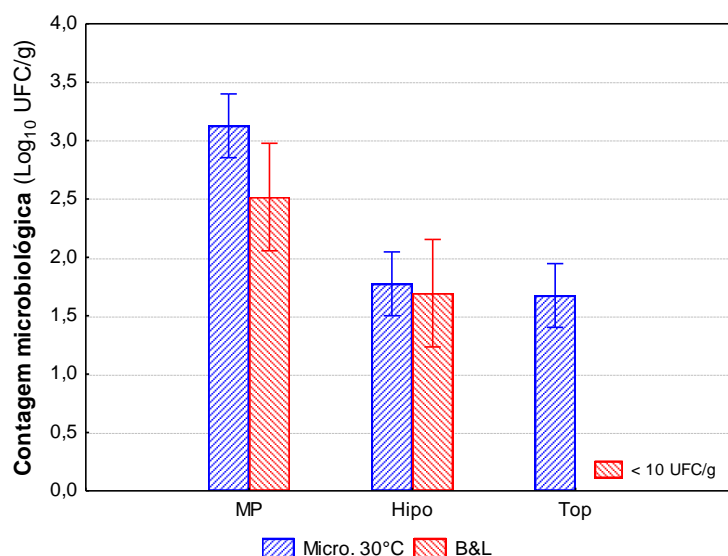


Figura 31 - Contagens de microrganismos a 30 °C e de bolores e leveduras, na amostra controlo e nas amostras de pera Rocha minimamente processada (HIPO e Top), após processamento. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

Os valores apresentados na Figura 32 expressam a evolução da contaminação microbiológica presente nas amostras durante o armazenamento (15 dias, 5 °C). Nas amostras HIPO o desenvolvimento microbiano relativo ao grupo Micro 30 °C só teve significado no último período testado, alcançando no final da armazenagem contagens de

3,6 Log₁₀UFC.g⁻¹. A mesma evolução é verificada para as amostras Top no entanto com contagens significativamente inferiores (2,5 Log₁₀UFC.g⁻¹) a declarar que a aplicação deste tratamento apresenta efeitos significativos no controlo do desenvolvimento microbiológico.

Para o grupo de B&L verificou-se nas amostras HIPO a manutenção das contagens até ao 7º dia com aumento significativo ($p < 0,05$) para o dia 15 (ca de 2,4 Log₁₀UFC.g⁻¹). O comportamento das amostras Top contrasta com o anterior em que não se verificou a presença de B&L (<10 UFC.g⁻¹) ao longo de todo o período de armazenamento mostrando a eficácia do tratamento face à redução deste grupo.

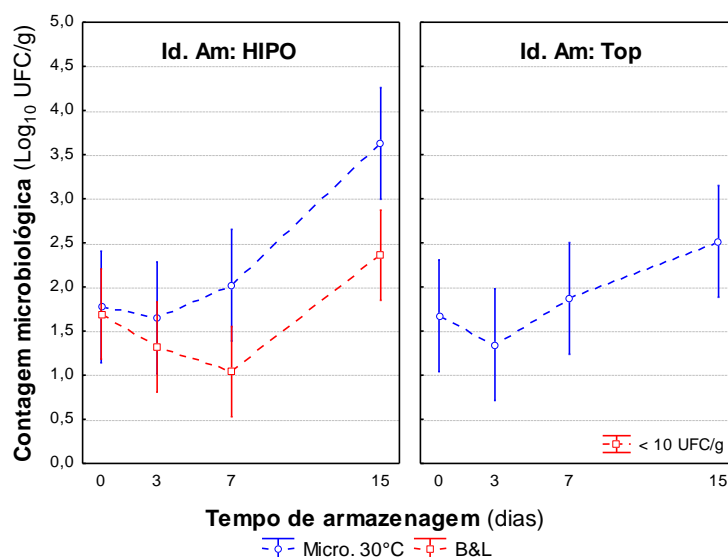


Figura 32 - Contagens de microrganismos aeróbios a 30 °C e de bolores e leveduras, nas amostras de pera Rocha minimamente processadas (HIPO e Top) ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

No entanto cabe referir que ao dia 15 ambas as amostras apresentam contagens microbiológicas aceitáveis face aos critérios normalmente utilizados para estes produtos e que referem a inaceitabilidade do produto quando se alcançam valores $\geq 7,0$ Log₁₀UFC.g⁻¹ para o grupo dos mesófilos (PHLS, 2000).

Conclusão

A aplicação de Top (40 °C, 40 min) como tratamento alternativo à operação de descontaminação no processamento mínimo de pera Rocha, em quartos, demonstrou ser eficaz, alcançando a eliminação do grupo de B&L durante a armazenagem refrigerada do produto (15 dias com contagens <10 UFC.g⁻¹). No que concerne ao grupo de Micro 30 °C, os efeitos do Top foram significativos para o controlo do desenvolvimento do mesmo, registando diferenças em ca de 1 ciclo Log face a quartos descontaminados com HIPO.

Acresce aos efeitos do tratamento Top a minimização das alterações de cor durante a armazenagem do produto, particularmente as verificadas na zona identificada como mais suscetível ao escurecimento enzimático (superfície de descasque).

O escurecimento da superfície crítica foi determinante para a aceitabilidade das amostras de pera minimamente processadas. Desta forma, observou-se a rejeição dos quartos ao fim de 7 dias na condição de descontaminação com HIPO, situação não verificada nos quartos tratados termicamente e que prevê a possibilidade da extensão do período de vida útil do produto.

4 Conclusões gerais e perspectivas futuras

No âmbito da conservação pós-colheita de pera Rocha os estudos de avaliação de tratamentos físicos: térmico e sonicação e, biocontrolo, respetivos efeitos singular e integrados, permitiram concluir:

- Através da metodologia de superfície de resposta (RSM) selecionou-se a intensidade do tratamento térmico expressa pelo binómio 40 °C durante 40 minutos (pela imersão de frutos inteiros em banhos de água) como a condição que permite reduzir a microbiota inicial sem prejuízo dos atributos da qualidade do fruto em fresco. A previsão dos modelos foi posteriormente validada tendo sido confirmada a diminuição significativa ($p < 0,05$) do grupo dos microrganismos a 30 °C (~1 ciclo Log), a eliminação do grupo de bolores e leveduras ($< 10 \text{ UFC.g}^{-1}$) bem como a manutenção dos valores de firmeza, de cor, de pH e do teor de sólidos solúveis característicos do fruto em fresco.
- A termossonicação - integração de tratamento térmico com a sonicação (frequência de 42 kHz) não revelou efeitos acrescidos face à aplicação singular do tratamento térmico. Neste sentido os mecanismos de ação letal e/ou de cavitação ultrassónica que poderiam promover a eliminação da microbiota não se manifestaram para a frequência testada.
- Nas condições testadas de armazenagem pós-colheita de pera Rocha (7 °C, 60 dias) verificou-se a ineficácia dos efeitos do antagonista comercial *Blossom Protect*TM.
- A integração de tratamento térmico moderado (40 °C / 40 min) com o biocontrolo (*Blossom Protect*TM) não revelou efeitos acrescidos face à aplicação singular do tratamento térmico na prevenção da qualidade do fruto nas condições testadas de armazenagem pós-colheita de pera Rocha (7 °C, 60 dias).
 - A aplicação de calor (40 °C / 40 min) preveniu de forma significativa (100%) a incidência da podridão no fruto causada por *Penicillium expansum*, em condições de armazenagem simuladas (7 °C, 60 dias), perspetivando-se efeitos similares nas condições reais de armazenagem em que a temperatura é inferior (0 °C).
 - Não ficaram esclarecidos os efeitos do tratamento térmico moderado (40 °C / 40 min) na eventual prevenção de danos fisiológicos (acastanhamento interno e escaldão superficial) de pera Rocha. Assim, o acompanhamento das alterações fisiológicas foi consideravelmente desvirtuado perante a aceleração dos fenómenos de amadurecimento pós-colheita (amolecimento excessivo face aos valores iniciais),

especialmente pela elevação da temperatura face à condição real de armazenagem (de 7 para 0 °C) associado ao comportamento climatérico do fruto.

No âmbito do processamento alimentar os estudos de avaliação da aplicação do tratamento térmico à matéria-prima prévio às operações de processamento mínimo de pera Rocha permitiram concluir:

- A aplicação de calor (40 °C / 40 min) constitui uma alternativa viável e ecológica (reduzindo de forma significativa 99,9% da contaminação inicial de B&L) à utilização de hipoclorito de sódio, sem prejuízo das características físico-químicas e sensoriais dos frutos, bem como exercer efeitos no controlo do desenvolvimento microbiológico durante a armazenagem (5 °C, 15 dias).
- O tratamento térmico contribuiu para atrasar os fenómenos de escurecimento dos frutos durante a armazenagem que se manifestam mais acentuados ao nível das superfícies descascadas. Este efeito é importante porque foi assinalado como fator crítico na aceitação sensorial. Tendo em conta este critério na definição do período de vida útil a opção por este tratamento refletiu um ganho de 4 dias para o respetivo período de vida útil.

Na continuidade deste trabalho e para dar resposta às questões que ficaram por esclarecer propõe-se os seguintes estudos:

- Avaliação dos efeitos do tratamento térmico, aplicação singular, sobre a fisiologia dos frutos em condições reais de armazenagem da pera Rocha (0 °C), nomeadamente no controlo de acidentes fisiológicos (escaldão e escurecimento interno).
- Para o tratamento de termossonicação deveriam ser testadas outras frequências de ultrassons com o objectivo de baixar a intensidade do tratamento térmico, nomeadamente diminuir o tempo de tratamento (<40 minutos).
- Para o tratamento de biocontrolo poderão ser testadas outras concentrações de antagonista bem como outras formas de aplicação (e.g. revestimentos comestíveis) que garantam a adesão do mesmo à superfície do fruto.
- Testar a nível industrial a aplicação do tratamento térmico (40 °C / 40 min) em alternativa à sanitização da matéria-prima com hipoclorito de sódio numa linha de processamento mínimo.

5 Referências bibliográficas

Abreu, M. (2002). Frutos minimamente processados - Características e tecnologias de conservação. *INETI*. Lisboa.

Abreu, M. (2010). Tratamentos Integrados para a Qualidade de Pera Rocha Minimamente Processada. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia. 293. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Agro-Industrial.

Abreu, M.; Gonçalves, E.; Alegria, C.; Campos, G.; Moldão-Martins, E.; Empis, J. (2005). Aplicação de pré-tratamentos térmicos para o prolongamento de vida útil de Pera Rocha minimamente processada. *Encontro de Química dos Alimentos*. 1-7.

Abreu, M.; Alegria, C.; Gonçalves, E.; Pinheiro, J.; Moldão-Martins, M.; Empis, J. (2011). Modeling of Preheat Treatment Optimization Applied To Fresh-Cut "Rocha" Pear. *Journal of Food Quality*, 34 (5): 315-326.

Abreu, M.; Beirão-da-Costa, S.; Gonçalves, M.; Beirão-da-Costa, M.; Moldão-Martins, M. (2003). Mild heat pre-treatment to promote quality retention of fresh-cut "Rocha" pear. *Postharvest Biology*, 30: 153-160.

Alegria, C.; Pinheiro, J.; Gonçalves, E.; Fernandes, I.; Moldão-Martins, M.; Abreu, M. (2009). Quality attributes of shredded carrot (*Daucus carota* L. cv. Nantes) as affected by alternative decontamination processes to chlorine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10: 61-69.

Almeida, D. (2005). Manuseamento de Produtos Hortofrutícolas. 1ª edição. Porto: Sociedade Portuguesa de Inovação. 111.

ANP (2012). Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha - Caderno de Especificações da Pera Rocha DOP. 13.

ANP (2009). Colocação no mercado de produtos fitofarmacêuticos. Caso da Difenilamina (DPA). *InfoRocha*. Disponível em: http://www.perarocha.pt/_uploads/inforocha/info09/Info49.pdf. Acesso em 12/03/2014.

Arteaga, G.; Li, E.; Varquez, M.; Nakai, S. (1994). Systematic experimental designs for product formula optimization. *Trends in Food Science and Technology*, 5: 243-254.

Benato, E.; Cia, P.; Souza, N. (2001). Manejo de doenças de frutas pós-colheita. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 9: 403-440.

Beuchat, L. (1998). Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. *Food Safety Issues*, 98.(2): 42.

Breidt, F.; Costilow, R. (2004). Processing and safety - *Acidified Foods: Principles of Handling and Preservation*. Saint Charles: Pickle Packers International. 5-1 a 5-15. Disponível em: <http://fbns.ncsu.edu/USDAARS/Acrobatpubs/P322-328/P328.pdf>. Acesso em: 24/03/2014.

Brewer, M. (2011). Natural antioxidants: source, compounds, mechanisms of action, and potencial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 211-247.

Bolin, H.; Huxsoll, C. (1991). Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. *Journal of Food Science*, 56: 416-418.

Borges, M.; Pedro, J.; Barreiro, M. (2004). Biological control of postharvest decay with epiphytic microorganisms of Rocha pear. In: *Maturação e Pós-Colheita - Frutos e Hortícolas*. Oeiras: Ed. M. Graça Barreiro/EAN-INIAP. 513-517.

Chang, G.; Huang, D.; Agrawal, C.; Kuo, C.; Wu, H. (2007). Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal frens used as "Gusuibu". *Botanical studies*, 48: 397-406.

Costa, I.; Veiga, P. (1996). Inibição do desenvolvimento de *Penicillium expansum* por fungicidas, *in vitro*. *Ciência Rural*, 26 (3): 357-360.

Dafne (s.d.). Produtos de Colorimetria – Fundamentos. Disponível em: <http://www.dafne.pt/produtos/colorimetria/fundamentos.html>. Acesso em 17/03/2014.

Diretiva 2009/859/CE do Concelho de 29 de Junho de 2012 relativa à não aprovação da substância ativa difenilamina (JO L 171 de 30.6.2012, 2-3).

Diretiva 91/414CEE do Conselho de 15 de Julho de 1991 relativa à comercialização de produtos fitossanitários (JO L 230 de 19.8.1991, 1-31).

El Ghaouth, A.; Droby, S.; Wilson, C. (2004). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. In *Applied Mycology and Biotechnology: Agriculture and Food Production*. Amsterdam: Elsevier Science. 11-27.

Fallik, E. (2004). Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). *Postharvest Biology and Technology*, 32 (2): 125-134.

Fallik, E.; Grinberg, S.; Gambourg, M.; Lurie, S. (1995). Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. *Plant Pathology*, 45: 92-97.

Fialho, D.; Silva, F. (2010). Doenças pós-colheita de pomóideas na região a Oeste da Serra de Candeeiros. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 26: 202-203.

Fischer, I.; Almeida, A.; Fileti, M.; Bertani, R.; Arruda, M.; Bueno, C. (2010). Avaliação de *Passifloraceas*, fungicidas e *Trichoderma* para o manejo da podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (3): 709-717.

Gabinete de Planeamento e Políticas. (2013). Anuário Agrícola. Disponível em: <http://www.gpp.pt>. Acesso em 20/03/2014.

Guerzoni, M.; Gianotti, A.; Corbo, M.; Sinigaglia, M. (1996). Shelf-life modeling for fresh-cut vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 9: 195-207.

Gogate, P. e Kabadi, A. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Journal Biochemical Engineering*, 44: 60-72.

Gorny, J.; Cifuentes, R.; Hess-Pierce, B.; Kader, A. (2000). Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by cultivar, ripeness storage, fruit size, and storage regime. *Journal of Food Science*, 65 (3): 541-544.

Hung, H.; Joshipura, K.; Jiang, R.; Hu, F.; Hunter, D.; Smith-Warner, S.; Colditz, G.; Rosner, B.; Spiegelman, D.; Willett, W. (2004). Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 96: 1577-1584.

Jeng, D.; Lin, L.; Hervey, L. (1990). Importance of ultrasonication conditions in recovery of microbial contamination from material surfaces. *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 479-484.

Kader, A. (1999). Fruit maturity, ripening, and quality relationships. *Acta Horticulturae*, 485: 203-208.

Kim, J.; Yousef, E.; Dave, S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of Food Protection*, 62 (9): 1071-1087.

Klein, J.; Conway, W.; Whitaker, B.; Sams, C. (1997). *Botrytis cinerea* decay in apples is inhibited by postharvest heat and calcium treatments. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 91-94.

Kunchit, J.; Somsri, C.; Parunya, T.; Monrueedee, S. (2013). Nutrients and bioactive compounds of Thai indigenous fruits. *Food Chemistry*, 140: 505-512.

Leverentz, B.; Janisiewicz, W.; Conway, W.; Saftner, R.; Fuchs, Y.; Sams, C. (2000). Combining yeasts or a bacterial biocontrol agent and heat treatment to reduce postharvest decay of Gala apples. *Postharvest Biology and Technology*, 21: 87-94.

Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14 (3): 257-269.

Mari, M.; Neri, F.; Bertolini, P. (2010). New approaches for postharvest disease control in Europe - Postharvest Pathology. Springer: Heidelberg. 119-136.

Marques, I. (2012). Conservação de frutas: Redução de doenças de pós-colheita em pera "Rocha". Lisboa: Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia. 66. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências e Engenharia de Alimentos.

Mitcham, E.; Monzon, M. (s.d.). Maintaining Quality of Stored Bartlett Pears with Modified Atmosphere Pallet Covers. Davis: Department of Plant Sciences, University of California. 15.

Moldão, M., Empis, J. (2000). Produtos hortofrutícolas frescos ou minimamente processados – Processamentos mínimos. Porto: Sociedade Portuguesa de Inovação, S.A.. 1-99.

Montgomery, D. (1991). Design and analysis of experiments. 3rd edition. New York: John Wiley and Sons.

Nguyen-The, C.; Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Food Science and Nutrition*, 34: 371-401.

Norma ISO 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds.

Norma ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C.

Norma ISO 6887-4:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Norma ISO 7218: 2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations.

Nunes, C. (2011). Biological control of postharvest diseases of fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 181-196.

Oliveira, C. (2007). Tecnologia pós-colheita para melhoria da qualidade e segurança alimentar: pêra, maçã e kiwi. ISAPress, Lisboa. 52.

Paull, R.; Chen, N. (2000). Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 21 (1): 21-37.

PHLS (2000). Public Health Laboratory Service - Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat food samples at the point of sale. *Communicable Diseases Public Health*, 3 (3): 163-167.

Piyasena, P.; Dussault, C.; Koutchma, T.; Ramaswamy, H.; Awuah, G. (2003). Radio frequency heating of foods: Principles, applications and related properties - A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43: 587-606.

Porte, A.; Maia, L. (2001). Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. *B.CEPPA*, 19 (1): 105-118.

Prange, R.; Wright, H.; DeLong, J.; Harrison, A.; Gunawardena, A. (2010). The effect of temperature and other factors on chlorophyll a fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). *Postharvest Biology and Technology*, 55: 21-28.

Prestes, A. (2003). Fungicidas: mecanismos de ação e resistência - Parte 1: fungicidas com mecanismo de ação não específica. *Revisão anual de patologia de planta*, 11: 43-69.

Raso, J.; Pagan, R.; Condon, S.; Sala, F. (1998). Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 465-471.

Robiglio, A.; Sosa, M.; Lutz, M.; Lopes, C.; Sangorrín, M. (2011). Yeast biocontrol of fungal spoilage of pear stores at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 147 (3): 211-216.

Saltveit, M. (2004). Respiratory metabolism. In: Gross, K.C., Yang, C.Y. and Saltveit, M. - The commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stocks. *USDA Agricultural Handbook number 66*. Washington DC: USDA. Disponível em: www.ba.ars.usda.gov/hb66/contents.html. Acesso a 9/04/2014.

Sams, C.; Conway, W.; Abbott, J.; Lewis, R.; Ben-Shalom, N. (1993). Firmness and decay of apples following postharvest pressure infiltration of calcium and heat treatment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118: 623-627.

Sánchez, C.; Barrerio, M. (2012). Controlo biológico de doenças de pós- colheita: situação actual e perspectivas futuras. *Revista da Associação Portuguesa de Horticultura*, 108: 29-33.

Sapers, G. (2001). Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology*, 39 (4): 305-311.

- Senhor, R.; Souza, P.; Neto, R.; Maracajá, P. (2009). Manejo de doenças pós-colheita. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa*, 4 (1): 13.
- Seymour, I.; Burfoot, D.; Smith, R.; Cox, L.; Lockwood, A. (2002). Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 547-557.
- Silva, J.; Finger, F.; Corrêa, P. (2008). Armazenamento de frutas e hortaliças - Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. 2ª edição. Viçosa: Aprenda Fácil. 469-502.
- Simons, L.; Sanguansri, P. (1997). Advances in washing of minimally processed vegetables. *Food Australia*, 49 (2): 75-80.
- Soares, J.; Silva, A.; Marques, H. (2003). O livro da pêra Rocha: intensificação cultural e regulação da produção. 2ª edição. Cadaval: Associação Nacional de Produtores de Pêra Rocha. 191.
- Sousa, A.; Sousa, A. (2005). O bolor azul (*Penicillium* spp.) das pêras e maçãs. *Jornal de Informação Técnica – AVAPI*, 67: 10-12.
- Spotts, R.; Cervantes, L.; Fecteau, T. (2002). Integrated control of brown rot of sweet cherry fruit with a preharvest fungicide, a postharvest yeast, modified atmosphere packaging, and cold storage temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 23 (3): 251-257.
- Swain, T.; Hillis, W. (1956). The phenolic constituents of *Prunus domestica* - The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10: 63-68.
- Watada, A.; Abe, K.; Yamuchi, N. (1990). Physiologic activities of partially processed fruits and vegetables. *Food Technology*, 44 (5): 116-122.
- Watada, A.; Qi, L. (1999). Quality of fresh-cut produce. *Postharvest Biology and Technology*, 15 (3): 201-205.
- Wilson, C.; Wisniewski, M.; Biles, C.; McLaughlin, R.; Chalutz, E.; Droby, S. (1991). Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection. Guildford*. 172-177.
- Xiao, C. (2005). Postharvest diseases of apples and pears – A Guide to diagnosis and control. In *Tree Fruit Research & Extension Center – Tree Fruit Postharvest Pathology*. Washington State University. Disponível em: <http://decay.tfrec.wsu.edu/index.php>. Acesso em 11/09/2014.

6 Anexos

Anexo A - Tabelas referentes ao ensaio 3.4.1

Tabela A1 - Matriz da otimização (RSM) do tratamento térmico (binómio tempo / temperatura) com os respetivos registos fotográficos.
















| Identificação das amostras | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Registo fotográfico |
|----------------------------|------------------|-------------|---|
| A | 48 | 28 |  |
| B | 60 | 15 |  |
| C | 35 | 40 |  |
| D | 48 | 28 |  |
| E | 48 | 28 |  |
| F | 48 | 28 |  |
| G | 48 | 10 |  |
| H | 60 | 40 |  |
| I | 48 | 45 |  |
| J | 35 | 15 |  |
| K | 30 | 28 |  |
| L | 65 | 28 |  |
| M | 48 | 28 |  |
| N | 48 | 28 |  |
| MP | | |  |

Tabela A2 - Análise de variância dos modelos do ensaio RSM para otimização do binómio temperatura / tempo para os atributos, L*, Hue, TCD, Micro 30 °C, B&L e firmeza.

| Atributos | | T(L) | T(Q) | t(L) | t(Q) | T*t | Falta de Ajuste | Erro Puro | SS Total |
|-------------|----|----------|---------|---------|---------|---------|-----------------|-----------|----------|
| L* | SS | 1017,499 | 100,049 | 220,189 | 9,671 | 37,334 | 1,041 | 17,768 | 1398,56 |
| | df | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 5 | 13 |
| | MS | 1017,499 | 100,049 | 220,189 | 9,671 | 37,334 | 0,347 | 3,554 | |
| | F | 286,324 | 28,154 | 61,961 | 2,722 | 10,506 | 0,098 | | |
| | p | 0,00001 | 0,00318 | 0,00053 | 0,1599 | 0,0229 | 0,9579 | | |
| Hue | SS | 1258,289 | 97,126 | 246,080 | 11,786 | 23,200 | 15,838 | 20,935 | 1680,05 |
| | df | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 5 | 13 |
| | MS | 1258,289 | 97,126 | 246,080 | 11,786 | 23,200 | 5,279 | 4,187 | |
| | F | 300,523 | 23,197 | 58,773 | 2,815 | 5,541 | 1,261 | | |
| | p | 0,00001 | 0,00481 | 0,00060 | 0,1542 | 0,06524 | 0,38184 | | |
| TCD | SS | 1626,939 | 190,569 | 324,493 | 1,835 | 48,437 | 11,232 | 19,668 | 2217,35 |
| | df | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 5 | 13 |
| | MS | 1626,939 | 190,569 | 324,493 | 1,835 | 48,437 | 3,744 | 3,934 | |
| | F | 413,593 | 48,446 | 82,491 | 0,467 | 12,313 | 0,952 | | |
| | p | 0,00001 | 0,00094 | 0,00027 | 0,52494 | 0,01712 | 0,48270 | | |
| Micro 30 °C | SS | 1,60591 | 0,99827 | * | * | * | 0,24863 | 1,32 | 4,235 |
| | df | 1 | 1 | * | * | * | 6 | 5 | 13 |
| | MS | 1,60591 | 0,99827 | * | * | * | 0,04144 | 0,264 | |
| | F | 6,08299 | 3,78134 | * | * | * | 0,15696 | | |
| | p | 0,05678 | 0,10943 | * | * | * | 0,97838 | | |
| B&L | SS | 17,157 | 4,379 | 3,626 | 1,236 | 0,742 | 1,421 | 3,808 | 32,989 |
| | df | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 5 | 13 |
| | MS | 17,157 | 4,379 | 3,626 | 1,236 | 0,742 | 0,474 | 0,762 | |
| | F | 22,526 | 5,749 | 4,761 | 1,623 | 0,974 | 0,622 | | |
| | p | 0,00512 | 0,06180 | 0,08091 | 0,2587 | 0,36893 | 0,63064 | | |
| Firmeza | SS | * | * | 0,0758 | 3,2421 | * | 3,5112 | 2,8733 | 9,7286 |
| | df | * | * | 1 | 1 | * | 6 | 5 | 13 |
| | MS | * | * | 0,0758 | 3,2421 | * | 0,5952 | 0,5747 | |
| | F | * | * | 0,1320 | 5,6417 | * | 1,0184 | | |
| | p | * | * | 0,7312 | 0,0635 | * | 0,5024 | | |

SS – soma dos quadrados, df – graus de liberdade; MS – quadrados médios; F – Teste de Fisher; p – p-value; * - Efeito eliminado

Tabela A3 - Valores médios (\pm DP) dos atributos de qualidade avaliados na otimização do modelo (RSM) de frutos tratados (Id. A a N) face a frutos não tratados (MP).

| Id. Amostra | Temperatura (°C) | Tempo (min) | L* | °H | TCD | Firmeza (N) | pH | TSS |
|-------------|------------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|-----|------|
| A | 48 | 28 | 64,4 \pm 6,6 | 78,8 \pm 6,0 | 13,8 \pm 7,3 | 7,7 \pm 1,8 | 4,7 | 15,4 |
| B | 60 | 15 | 55,4 \pm 8,7 | 70,6 \pm 14,4 | 25,3 \pm 12,0 | 7,1 \pm 0,7 | 4,6 | 14,6 |
| C | 35 | 40 | 68,5 \pm 4,3 | 88,3 \pm 5,1 | 6,2 \pm 5,3 | 8,0 \pm 1,1 | 4,7 | 15,5 |
| D | 48 | 28 | 64,8 \pm 4,4 | 79,4 \pm 6,9 | 12,9 \pm 6,5 | 7,1 \pm 0,7 | 4,7 | 12,9 |
| E | 48 | 28 | 62,6 \pm 7,6 | 80,7 \pm 13,3 | 14,0 \pm 23,4 | 8,7 \pm 0,9 | 4,9 | 13,7 |
| F | 48 | 28 | 61,9 \pm 6,6 | 79,3 \pm 6,5 | 14,9 \pm 7,6 | 7,0 \pm 1,3 | 4,9 | 12,8 |
| G | 48 | 10 | 69,2 \pm 2,4 | 91,3 \pm 3,6 | 4,2 \pm 3,1 | 9,4 \pm 0,7 | 4,9 | 12,5 |
| H | 60 | 40 | 39,4 \pm 1,7 | 57,3 \pm 1,0 | 43,4 \pm 2,1 | 6,7 \pm 0,7 | 5,0 | 12,7 |
| I | 48 | 45 | 53,3 \pm 5,7 | 71,7 \pm 4,6 | 24,9 \pm 6,2 | 9,1 \pm 0,8 | 4,8 | 12,9 |
| J | 35 | 15 | 72,4 \pm 3,2 | 92,1 \pm 3,7 | 2,0 \pm 3,4 | 8,0 \pm 1,3 | 5,0 | 12,4 |
| K | 30 | 28 | 72,2 \pm 3,3 | 89,1 \pm 3,8 | 4,2 \pm 2,8 | 7,8 \pm 0,9 | 4,6 | 12,4 |
| L | 65 | 28 | 40,7 \pm 1,4 | 55,0 \pm 2,2 | 42,5 \pm 2,0 | 7,5 \pm 0,1 | 5,0 | 14 |
| M | 48 | 28 | 60,4 \pm 7,3 | 76,0 \pm 7,0 | 17,6 \pm 8,5 | 7,6 \pm 0,8 | 4,9 | 13,4 |
| N | 48 | 28 | 65,21 \pm 4,8 | 81,9 \pm 5,4 | 11,9 \pm 6,0 | 6,5 \pm 0,5 | 4,7 | 16,7 |
| MP | | | 73,2 \pm 3,4 | 93,1 \pm 3,8 | | 9,0 \pm 0,1 | 4,9 | 13,0 |

L*-Luminosidade (carepa); °H-Hue (carepa); TCD-Diferença total de cor; TSS-Teor de sólidos solúveis;

Anexo B - Tabela referente ao ensaio 3.4.2

Tabela B1 - Valores médios (\pm DP) dos atributos de qualidade avaliados nos frutos após tratamentos: US, Top e Top x US de pera Rocha.

| Id. Amostra | L* | °H | WI | Firmeza (N) | pH | TSS |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| C | 68,6 ^a \pm 2,9 | 96,6 ^a \pm 5,7 | 74,7 ^a \pm 3,2 | 10,3 ^a \pm 1,7 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 13,1 ^a \pm 0,5 |
| US | 68,9 ^a \pm 3,3 | 95,2 ^a \pm 7,1 | 74,2 ^a \pm 3,7 | 9,4 ^a \pm 2,1 | 4,7 ^a \pm 0,1 | 13,1 ^a \pm 0,4 |
| Top | 70,3 ^a \pm 3,7 | 95,3 ^a \pm 7,5 | 72,4 ^a \pm 3,6 | 8,9 ^a \pm 2,5 | 4,7 ^a \pm 0,1 | 13,4 ^a \pm 1,3 |
| Top x US | 68,5 ^a \pm 1,1 | 96,6 ^a \pm 7,3 | 73,1 ^a \pm 2,2 | 9,4 ^a \pm 1,5 | 4,6 ^a \pm 0,2 | 13,1 ^a \pm 0,6 |

Na mesma coluna, valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey).

L*-Luminosidade (carepa); °H-Hue (carepa); WI-Índice de escurecimento (polpa); TSS-Teor de sólidos solúveis

Anexo C - Tabelas referentes ao ensaio 3.4.3

Tabela C1 - Valores médios (\pm DP) dos atributos de qualidade avaliados face a frutos não tratados (C) e frutos tratados com: Top e Top x A durante o armazenamento (60 dias, 7 °C).

| Id. Amostra | Tempo de armazen. (dias) | Perda de massa (%) | L* | °H | WI | Firmeza (N) | pH | TSS | CFT (mg EAC.100 g ⁻¹) |
|-------------|--------------------------|-----------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| C | 0 | 0,0 ^a \pm 0,0 | 67,8 \pm 1,6 | 103,6 ^a \pm 0,9 | 75,3 ^{ab} \pm 0,8 | 10,6 ^a \pm 0,2 | 4,6 ^{ab} \pm 0,2 | 10,9 ^a \pm 0,3 | 43,5 \pm 7,9 |
| | 15 | 2,2 ^b \pm 0,2 | 69,8 \pm 2,4 | 95,5 ^{bc} \pm 1,1 | 75,9 ^a \pm 0,4 | 7,1 ^b \pm 1,1 | 4,8 ^{ab} \pm 0,1 | 11,9 ^a \pm 0,5 | 40,3 \pm 11,9 |
| | 45 | 7,1 ^c \pm 1,0 | 72,9 \pm 3,1 | 88,3 ^d \pm 3,2 | 72,8 ^{ab} \pm 1,9 | 2,8 ^c \pm 1,1 | 4,5 ^{ab} \pm 0,1 | 11,4 ^a \pm 0,1 | 48,5 \pm 11,1 |
| | 60 | 8,7 ^{de} \pm 1,0 | 70,0 \pm 2,9 | 88,0 ^d \pm 1,6 | 68,9 ^{bc} \pm 3,4 | 1,8 ^c \pm 0,7 | 4,7 ^{ab} \pm 0,1 | 11,9 ^a \pm 0,4 | 54,5 \pm 6,7 |
| Top | 0 | 0,0 ^a \pm 0,0 | 68,6 \pm 3,7 | 99,8 ^{ab} \pm 1,8 | 74,5 ^{ab} \pm 0,3 | 10,2 ^a \pm 0,4 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 11,9 ^a \pm 0,7 | 27,2 \pm 2,9 |
| | 15 | 3,1 ^b \pm 0,1 | 68,9 \pm 1,8 | 95,6 ^{bc} \pm 2,3 | 75,8 ^a \pm 0,6 | 9,1 ^{ab} \pm 1,1 | 4,6 ^{ab} \pm 0,2 | 11,9 ^a \pm 0,5 | 48,3 \pm 2,8 |
| | 45 | 7,6 ^{cd} \pm 0,5 | 73,2 \pm 1,1 | 90,1 ^{de} \pm 1,5 | 73,5 ^{ab} \pm 0,5 | 2,8 ^c \pm 0,2 | 4,6 ^{ab} \pm 0,1 | 11,6 ^a \pm 1,2 | 60,4 \pm 4,7 |
| | 60 | 9,8 ^e \pm 0,2 | 60,8 \pm 1,1 | 80,4 ^f \pm 2,0 | 64,0 ^c \pm 6,4 | 1,7 ^c \pm 0,8 | 4,5 ^{ab} \pm 0,2 | 13,4 ^a \pm 1,1 | 60,9 \pm 7,7 |
| Top x A | 0 | 0,0 ^a \pm 0,0 | 66,8 \pm 2,7 | 102,2 ^a \pm 0,8 | 74,2 ^{ab} \pm 0,4 | 10,1 ^a \pm 0,9 | 4,8 ^a \pm 0,1 | 11,8 ^a \pm 1,5 | 30,2 \pm 1,0 |
| | 15 | 3,0 ^b \pm 0,1 | 66,3 \pm 3,1 | 94,71 ^{ce} \pm 1,2 | 75,4 ^{ab} \pm 0,8 | 9,6 ^{ab} \pm 2,1 | 4,9 ^a \pm 0,2 | 11,8 ^a \pm 1,6 | 50,0 \pm 17,3 |
| | 45 | 7,5 ^{cd} \pm 0,5 | 69,8 \pm 1,2 | 86,1 ^d \pm 1,4 | 73,2 ^{ab} \pm 1,6 | 2,9 ^c \pm 0,7 | 4,4 ^b \pm 0,1 | 12,3 ^a \pm 1,2 | 70,2 \pm 13,3 |
| | 60 | 9,3 ^e \pm 0,2 | 69,3 \pm 1,2 | 85,8 ^d \pm 1,2 | 69,7 ^{abc} \pm 1,9 | 2,8 ^c \pm 0,9 | 4,5 ^{ab} \pm 0,1 | 12,4 ^a \pm 0,9 | 48,2 \pm 10,6 |

Na mesma coluna, valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey).

L*-Luminosidade (carepa); °H-Hue (carepa); WI-Índice de escurecimento (polpa); TSS-Teor de sólidos solúveis; CFT-Compostos fenólicos totais

Tabela C2 - Ficha de prova de análise sensorial para a pera inteira.

PROVA DE ANÁLISE SENSORIAL DE FRUTOS DE PERA ROCHA

Data: __/__/____

Nome: _____ Id. Amostra: _____

Assinale com uma cruz o ponto que melhor traduz a intensidade de percepção de cada atributo.

1. Cor

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------|---------------------|----------------------|---------|----------------|
| Verde | Moderadamente verde | Ligeiramente amarelo | Amarelo | Amarelo escuro |

2. Firmeza

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------|-------|---------------------|------|------------|
| Muito firme | Firme | Moderadamente firme | Mole | Muito mole |

3. Apreciação Global

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------|-----|------------|-----|-----------|
| Muito bom | Bom | Suficiente | Mau | Muito mau |

Anexo D - Tabelas referentes ao ensaio 3.4.4

Tabela D1 - Registos fotográficos das peras minimamente processadas tratadas com HIPO e Top ao longo do armazenamento (15 dias, 5 °C).









| Tempo | Hipo | | | Top | | |
|-------|---|---|---|--|---|---|
| 0 |  |  |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  |  |  |
| 15 |  |  |  |  |  |  |

Tabela D2 - Resultados médios (\pm DP) relativos à avaliação sensorial da firmeza das amostras HIPO e Top ao longo da armazenagem (15 dias, 5 °C).

| Identificação de amostras | Tempo (dias) | Firmeza |
|---------------------------|--------------|----------------------------|
| HIPO | 0 | 1,0 ^a \pm 0,0 |
| | 3 | 1,0 ^a \pm 0,0 |
| | 7 | 1,2 ^a \pm 0,4 |
| | 15 | 1,5 ^a \pm 0,5 |
| Top | 0 | 1,0 ^a \pm 0,0 |
| | 3 | 1,0 ^a \pm 0,0 |
| | 7 | 1,3 ^a \pm 0,5 |
| | 15 | 1,5 ^a \pm 0,5 |

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey).

Tabela D3 - Ficha de prova de análise sensorial para a pera minimamente processada.

PROVA DE ANÁLISE SENSORIAL DE FRUTOS DE PERA ROCHA

Data:___/___/___

Nome:_____ Id. Amostra:_____

Assinale com uma cruz o ponto que melhor traduz a intensidade de percepção de cada atributo.

1. Cor

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------|---------------------|---------------------|--------|--------------|
| Claro | Moderadamente claro | Ligeiramente escuro | Escuro | Muito escuro |

2. Firmeza

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------|-------|---------------------|------|------------|
| Muito firme | Firme | Moderadamente firme | Mole | Muito mole |

3. Apreciação Global

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------|-----|------------|-----|-----------|
| Muito bom | Bom | Suficiente | Mau | Muito mau |